Chromogen – Bildung der Neuraminsäure und anderer 2-Keto-3-Deoxy-Aldonsäuren

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Ferdinand Wirtz-Peitz
Bremke/Kreis Meschede

Bochum 1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546621_0013

Chromogen – Bildung der Neuraminsäure und anderer 2-Keto-3-Deoxy-Aldonsäuren

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Ferdinand Wirtz-Peitz
Bremke/Kreis Meschede

Bochum 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dissertation eingereicht am: 27. Juni 1969
Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1969

Referent: Prof. Dr. H. Faillard
Korreferent: Prof. Dr. G. Pfleiderer

INHALTSVERZEICHNIS

A. Literaturverzeichnis III

B. Verzeichnis der Abkürzungen XII

C. Theoretischer Teil 1

I. Einführung 1

II. Entdeckung und Isolierung der Neuraminsäure 4

III. Chemie der Neuraminsäure 8

1. Natürliche Derivate 8

2. Strukturaufklärung 10

3. Chemische Synthesen 15

IV. Bestimmungsmethoden 17

1. Ehrlich Reaktion 18

2. Bial/Svennerholm Reaktion 24

3. Dische Reaktion 27

4. Aminoff/Warren Reaktion 29

V. Transformation und Degradation der Neuraminsäure 34

1. Literatur-Übersicht 34

2. Arbeitshypothesen 41

3. Abgrenzung der Arbeit 52

D. Experimenteller Teil 56

I. Synthese-Methoden 56

1. 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren 56

2. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldonsäuren 60

3. Aldehyde und Pyrrol-2-carbonsäure 63

II. Arbeitsvorschriften 64

1. Kalium-oxalessigsäure-di-tert.-butylester . 64

2. N-Acetyl-amino-acetaldehyd 64

3. 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyd 67

4. 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure 69

5. 2-Keto-3-deoxy-hexonsäure 74

6. 2-keto-3-deoxy-nononsäure 75

7. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure 76

8. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure . 77

9. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hepton-
säure-ß-methylglykosid 78

10. Aldehyde 80

11. Pyrrol-2-carbonsäure 82

III. Analytische Methoden 83

IV. Analytische Ergebnisse 84

1. Aminoff Bestimmung 84

2. Bial/Svennerholm Bestimmung 86

V. Diskussion 99

1. Chromogen-Bildung der Aminoff/Warren Reakt. 99

2. Chromogen-Bildung der Bial/Svennerholm
Reaktion 105

3. Ausblick 114

E. Zusammenfassung 116

A. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen, C.F.H., M.R. Gilbert u. D.M. Young
   J. Org. Chem. 2, 227 (1937)
2. Aminoff, D.
   Virology 7, 355 (1959)
3. Aminoff, D.
   Biochem. J. 81, 384 (1961)
4. Aminoff, D., W.T.J. Morgan u. W.M. Watkins
   Biochem. J. 51, 379 (1952)
5. Anger, V. u. S. Ofri
   Z. Analyt. Chem. 203, 422 (1964)
6. Backer, H.J. u. J.D.H. Homann
   Rec. Trav. Chim. 58, 1048 (1939)
7. Barry, G.T.
   J. Exp. Med. 107, 507 (1958)
8. Barry, G.T. u. W.F. Goebel
   Nature (London) 179, 206 (1957)
9. Baumgarten, P.
   Chem. Ber. 59, 1166 (1926)
10. Berggard, I. u. L. Odin
    Arkiv Kemi 12, 581 (1958)
11. Bial, M.
    Deut. Med. Wochschr. 28, 253 (1902)
12. Bial, M.
    Deut. Med. Wochschr. 29, 477 (19o3)
13. Birkofer, L. u. F. Beckmann
    Ann. Chem. 620, 21 (1959)
14. Birkofer, L. u. R. Dutz
    Ann. Chem. 657, 94 (1962)
15. Blair, M.G. u. W. Pigman (Ed.)
    The Carbohydrates, Academic Press, New York
16. Blix, G.
    Z. Physiol. Chem. 240, 43 (1936)
17. Blix, G.
    Skand. Arch. Physiol. 80, 46 (1938)
18. Blix, G., A. Gottschalk u. E. Klenk
    Nature (London) 179, 1088 (1957)
19. Blix, G. u. E. Lindberg
    Acta Chem. Scand. 14, 1809 (1960)
20. Blix, G., E. Lindberg, L. Odin u. I. Werner
    Nature (London) 175, 340 (1955)

21. Blix, G., E. Lindberg, L. Odin u. I. Werner
Acta Soc. Med. Upsalien. 61, 1 (1956)

22. Blix, G., L. Svennerholm u. I. Werner
Acta Chim. Scand. 4, 717 (1950)

23. Blix, G., L. Svennerholm u. I. Werner
Acta Chem. Scand. 6, 358 (1952)

24. Böhm, P., St. Dauber u. L. Baumeister
Klin. Wochschr. 32, 289 (1954)

25. Browne, C.A. u. F.W. Zerban
Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis,
John Wiley and Sons, New York, 1941

26. Brug, J. u. G.B. Paerels
Nature (London) 182, 1159 (1958)

27. Brunetti, P., G.W. Jourdian u. S. Roseman
J. Biol. Chem. 237, 2447 (1962)

28. Cabello, J., B. Leon, V. Prajoux u. M. Plaza
Arch. Biochem Biophys. 107, 51 (1964)

29. Carrol, P.M. u. J.W. Cornforth
Bioch. Biophys. Acta 39, 161 (1960)

30. Cessi, C. u. F. Serafini-Cessi
Biochem. J. 88, 132 (1963)

31. Comb, D.G. u. S. Roseman
J. Am. Chem. Soc. 80, 497 (1958)

32. Comb, D.G. u. S. Roseman
J. Am. Chem. Soc. 80, 3166 (1958)

33. Comb, D.G. u. S. Roseman
J. Biol. Chem. 235, 2529 (1960)

34. Cornforth, J,W., M.E. Daines u. A. Gottschalk
Proc. Chem. Soc. (London) 1957, 25

35. Cornforth, J.W. u. M.E. Firth
J. Chem. Soc. 1958, 1091

36. Cornforth, J.W., M.E. Firth u. A. Gottschalk
Biochem. J. 68, 57 (1958)

37. Dische, Z.
Mikrochemie 8, 4 (1930)

38. Dische, Z.
J. Biol. Chem. 181, 379 (1949)

39. DeLey, J. u. M. Doudoroff
J. Biol. Chem. 227, 745 (1957)

40. David, S. u. A. Veyrières
Compt. Rend. 258, 3059 (1964)

41. Ehrlich, P.
Deut. Med. Wochschr. no. 15 (1901)

42. Elson, L.A. u. W.T.J. Morgan
Biochem. J. 27, 1824 (1933)

43. Faillard, H.
Z. Physiol. Chem. 317, 257 (1959)

44. Faillard, H. u. M. Blohm
Z. Physiol. Chem. 341, 167 (1965)

45. Faillard, H., G. Kirchner u. M. Blohm
Z. Physiol. Chem. 347, 87 (1966)

46. Folch, J., S. Arsove u. J.A. Meath
J. Biol. Chem. 191, 819 (1951)

47. Georgias, L.
Dissertation, Köln, 1966

48. Ghalambor, M.A., E.M. Levine u. E.C. Heath
J. Biol. Chem. 241, 3207 (1966)

49. Gibbons, R.A.
Analyst 87, 178 (1962)

50. Gibbons, R.A.
Biochem. J. 89, 380 (1963)

51. Gielen, W.
Z. Physiol. Chem. 342, 170 (1965)

52. Gielen, W.
Z. Physiol. Chem. 348, 329 (1967)

53. Gielen, W.
Z. Naturforsch. 23b, 1598 (1968)

54. Gottschalk, A.
Nature (London) 167, 845 (1951)

55. Gottschalk, A.
Nature (London) 172, 808 (1953)

56. Gottschalk, A.
Nature (London) 174, 652 (1954)

57. Gottschalk, A.
Biochem. J. 61, 298 (1955)

58. Gottschalk, A.
Nature (London) 176, 881 (1955)

59. Gottschalk, A.
Yale J. Biol. Med. 28, 525 (1956)

60. Gottschalk, A.
Arch. Biochem. Biophys. 59, 37 (1957)

61. Gottschalk, A.
Rev. Pure Appl. Chem. 12, 46 (1962)

62. Graham, E.R.B., W,H. Murphy u. A. Gottschalk
Biochim. Biophys. Acta 74, 22 (1963)

63. Hasse, K. u. A. Wieland
Chem. Ber. 93, 1686 (1960)

64. Heidelberger, C. u. R.B. Hurlbert
J. Am. Chem. Soc. 72, 4704 (1950)

65. Heimer, R. u. K. Meyer
Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 42, 728 (1956)

66. Hershberg, C. u. S.B. Binkley
J. Bid. Chem. 243, 1578 (1968)

67. Hershberg, C., M. Davis u. S.B. Binkley
J. Bid. Chem. 243, 1585 (1968)

68. Hess, E.L., A.F. Coburn, R.C. Bates u. P. Murphy
J. Clin. Invest. 36, 449 (1957)

69. Hess, E.L., J.W. Hahn u. W. Ayala
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 528 (1956)

70. Hiyama, N.
Tohoku J. Exp. Med. 51, 319 (1949)

71. Hurwitz, J. u. A. Weissbach
J. Biol. Chem. 234, 710 (1959)

72. Ingram, J.M. u. W.A. Wood
J. Biol. Chem. 240, 4146 (1965)

73. Izard, C., P. Rumpf u. C. Viel
Compt. Rend. 265, 2107 (1967)

74. Jamieson, G. A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 775 (1964)

75. Jennings, W.G., W.L. Dunkley u. H.G. Reiber
Food Research 20, 13 (1955)

76. Jochims, J.C., G.Taigel, A. Seeliger, P. Lutz u.
Tetrahedron Letters 44, 4363(67) H.E. Driesen

77. Karkas, J.D. u. E. Chargaff
J. Biol. Chem. 239, 949 (1964)

78. Kean, E.L. u. S. Roseman
J. Biol. Chem. 241, 5643 (1966)

79. Klenk, E.
Z. Physiol. Chem. 235, 24 (1935)

80. Klenk, E.
Z. Physiol. Chem. 262, 128 (1939)

81. Klenk, E.
Z. Physiol. Chem. 267, 128 (1941)

82. Klenk,E.
Z. Physiol. Chem. 268, 50 (1941)

83. Klenk, E.
Z, Physiol. Chem. 273. 76 (1942)

84. Klenk, E.
Z. Physiol. Chem. 288, 216 (1951)

85. Klenk, E. u. H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 298, 230 (1954)

86. Klenk, E., H. Faillard u. H. Lempfried
Z. Physiol. Chem. 301, 235 (1955)

87. Klenk, E., H. Faillard, F. Weygand u. H.H. Schöne
Z. Physiol. Chem. 304, 35 (1956)

88. Klenk, E. u. G. Uhlenbruck
Z. Physiol. Chem. 307, 266 (1957)

89. Klenk, E. u. H. Langerbeins
Z. Physiol. Chem. 270, 185 (1941)

90. Klenk, E. u. K. Lauenstein
Z. Physiol. Chem. 291, 147 (1952)

91. Kobert, K.
Z. Analyt. Chem. 46, 711 (1907)

92. Kovachevich, R. u. W.A. Wood
J. Bil. Chem. 213, 745 (1955)

93. Kuhn, R. u. G. Baschang
Chem. Ber. 95, 2384 (1962)

94. Kuhn, R. u. G. Baschang
Ann. Chem. 659, 156 (1962)

95. Kuhn, R. u. R. Brossmer
Chem. Ber. 87, 123 (1954)

96. Kuhn, R, u. R. Brossmer
Chem. Ber. 89, 2471 (1956)

97. Kuhn, R. u. R. Brossmer
Angew. Chem. 69, 534 (1957)

98. Kuhn, R. u. R. Brossmer
Ann. Chem. 616, 221 (1958)

99. Kuhn, R. u. R. Brossmer
Angew. Chem. 74, 252 (1962)

100. Kuhn, R. u. A. Gauhe
Chem. Ber. 98, 395 (1965)

101. Kuhn, R. u. G. Krüger
Chem. Ber. 89, 1473 (1956)

102. Kuhn, R. u. G. Krüger
Chem. Ber. 90, 264 (1957)

103. Kuhn, R. u. P. Lutz
Biochem. Z. 388, 554 (1963)

104. Kuhn, R., P. Lutz u. D.L. McDonald
Chem. Ber. 99, 611 (1966)

105. Kuhn, R., D. Weiser u. H. Fischer
Ann. Chem. 628, 207 (1959)

106. Kuhn, R. u. H. Wiegandt
Z. Naturforsch. 18b, 541 (1963)

107. Leaback, D.H. u. P.G. Walker
Biochim. Biophys. Acta 74, 297 (1963)

108. Levene, P.A. u. K. Landsteiner
J. Biol. Chem. 75, 687 (1927)

109. Levin, D.H. u. E. Racker
J. Biol. Chem. 234, 2532 (1959)

110. Ludewig, S. u. E.S. Glover
Arch. Biochem. Biophys. 113, 661 (1966)

111. Lutz, P., W. Lochinger u. G. Taigel
Chem. Ber. 101, 1089 (1968)

112. MacGee, J. u. M. Doudoroff
J. Biol. Chem. 210, 617 (1954)

113. Marshall, R.D. u. A. Gottschalk
Glycoproteins, Elsevier, 1966, p. 151 ff.

114. Mayer, F.C., R. Dam u. J.H. Pazur
Arch. Biochem. Biophys. 108, 356 (1964)

115. McCay, C.M. u. C.L.A. Schmidt
J. Am. Chem. Soc. 48, 1935 (1926)

116. Meindl, P. u. H. Tuppy
Mh. Chem. 96, 802 (1965)

117. Meindl, P. u. H. Tuppy
Mh. Chem. 97, 1628 (1966)

118. Meindl, P. u. H. Tuppy
Mh. Chem. 98, 53 (1967)

119. Merrick, J.M. u. S. Roseman
J. Biol. Chem. 235, 1274 (1960)

120. Michael, A. u. J.P. Ryder
Chem. Ber. 19, 1388 (1886)

121. Mitchell, H.K., H.H. Weinstock u. E.E. Snell
J. Am. Chem. Soc. 62, 1776 (1940)

122. Möller, F.
Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)
Band XI,1 p. 926 (1957)

123. Morgan, W.T.J. u. L.A. Elson
Biochem. J. 28, 988 (1934)

124. Müller, F.
Z. Biol. 42, 561 (1901)

125. Nef, J.U.
Ann. Chem. 403, 204 (1914)

126. Niazi, S. u. D. State
Cancer Research 8, 653 (1948)

127. Nordal, A. u. R. Klevstrand
Anal. Chim. Acta 4, 411 (1950)

128. Onodera, K., S. Hirano u. H. Hayashi
Agr. Biol. Chem. 30, 1170 (1966)

129. Paerels, G.B.
Rec. Trav. Chim. 80, 985 (1961)

130. Paerels, G.B. u. H.W. Geluk
Nature (London) 197, 379 (1963)

131. Paerels, G.B. u. J. Schut
Biochem. J. 96, 787 (1965)

132. Palleroni, N.J. u. M. Doudoroff
J. Biol. Chem. 223, 499 (1956)

133. Portsmouth, D.
Carbohyd. Res. 8, 193 (1968)

134. Portsmouth, D., A.C. Stoolmiller u. R.H. Abeles
J. Bil. Chem. 242, 2751 (1967)

135. Pröscher, F.
Z. Physiol. Chem. 31, 520 (1901)

136. Reichl, C.
Ber. d. Österr. Gesellsch. z. Förderung der chem. industrie 1, 74 (1879)

137. Reinitzer, F.
Z. Physiol. Chem. 14, 453 (1890)

138. Reissig, J.L., J.L. Strominger u. L.F. Leloir
J. Biol. Chem. 217, 959 (1955)

139. Rondle, C.N.J. u. W.T.J. Morgan
Biochem. J. 61, 586 (1955)

140. Roseman, S., G.W. Jourdian, D. Watson u. R. Rood
Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 958 (1961)

141. Schauer, R. u. H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 349, 961 (1968)

142. Schoop, H.J. u. H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 348, 1518 (1967)

143. Seibert, F.B., M.L. Pfaff u. M.V. Siebert
Arch. Biochem. Biophys. 8, 279 (1948)

144. Seliwanoff, F.
Chem. Ber. 20, 181 (1887)

145. Skurský, L.
Z. Naturforsch. 15b, 812 (1960)

146. Smiley, J.D. u. G. Ashwell
J. Biol. Chem. 235, 1571 (1960)

147. Sprinson, D.B., J. Rothschild u. M. Sprecher
J. Biol. Chem. 238, 3170 (1963)

148. Srinivasan, P.R. u. D.B. Sprinson
J. Biol. Chem. 234, 716 (1959)

149. Stoolmiller, A.C. u. R.H. Abeles
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 438 (1965)

150. Stoolmiller, A.C. u. R.H. Abeles
J. Biol. Chem. 241, 5764 (1966)

151. Svennerholm, L.
Arkiv Kemi 10, 577 (1957)

152. Svennerholm, L.
Bioch. Biophys. Acta 24, 604 (1957)

153. Szabo, P.
Advances in Chemistry Series 74, 94 (1968)

154. Thomson, R.H.
Quart. Rev. (London) 10, 27 (1956)

155. Tracey, M.V.
Biochem. J. 43, 185 (1948)

156. Treibs, A. u. E. Herrmann
Z. Physiol. Chem. 299, 168 (1955)

157. Walz, E.
Z. physiol. Chem. 166, 210 (1927)

158. Waravdekar, V.S. u. L.D. Saslaw
Biochim. Biophys. Acta 24, 439 (1957)

159. Waravdekar, V.S. u. L.D. Saslaw
J. Biol. Chem. 234, 1945 (1959)

160. Warren, L.
Fed. Proc. 18, 347 (1959)

161. Warren, L.
J. Biol. Chem. 234, 1971 (1959)

162. Warren, L.
Bioch. Biophys. Acta 83, 129 (1964)

163. Warren, L. u. Felsenfeld, H.
J. Biol. Chem. 237, 1421 (1962)

164. Weimberg, R.
J. Biol. Chem. 234, 727 (1959)

165. Weissbach, A. u. J. Hurwitz
J. Biol. Chem. 234, 705 (1959)

166. Werner, I. u. L. Odin
Acta Soc. Med. Upsalien. 57, 230 (1952)

167. Wesemann, W. u. F. Zillikem
Ann. Chem. 695, 209 (1966)

168. Weygand, F. u. H. Rinno
Z. Physiol. Chem. 306, 177 (1957)

169. Winzler, R.J.
Methods of Biochemical Analysis II, p. 279
Interscience Publ. Inc., New York, 1955

170. Wirtz-Peitz, F., R. Schauer u. H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 350, 111 (1969)

171. Yamakawa, T. u. S. Suzuki
J. Biochem. (Tokyo) 39, 175 (1952)

172. Zilliken, F., G. Braun u. P. György
Arch. Biochem. Biophys. 54, 564 (1955)

173. Tilliken, F. u. M.C. Glick
Naturwissenschaften 43, 536 (1956)

174. Zuckerkandel, F. u. L. Messiner-Klebermass
Biochem. Z. 236, 19 (1931)

B. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

DMAB	p-Dimethyl-amino-benzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxyd
Me	H_3C-
Ac	Acetyl-
NeuN	Neuraminsäure (Grundkörper)
NeuN-2-OMe	Neuraminsäure-ß-methylglykosid (Methoxyneuraminsäure)
NeuNAc	N-Acetyl-neuraminsäure
NeuNGl	N-Glykolyl-neuraminsäure
NeuNCbo	N-Carbobenzoxy-neuraminsäure
D-KDA	2-Keto-3-deoxy-D-arabonsäure
L-KDA	2-Keto-3-deoxy-L-arabonsäure
DL-KDA	2-Keto-3-deoxy-DL-arabonsäure (2-Keto-3-deoxy-pentonsäure)
KDG	2-Keto-3-deoxy-hexonsäure
KDG_{Glc}	2-Keto-3-deoxy-gluconsäure (2-Keto-3-deoxy-erythro-hexonsäure)
KDG_{Gal}	2-Keto-3-deoxy-galactonsäure (2-Keto-3-deoxy-threo-hexonsäure
KDH	2-Keto-3-deoxy-D-arabino-heptonsäure
KDO	2-Keto-3-deoxy-D-manno-octonsäure
C_5OH	2-Keto-3-deoxy-pentonsäure (DL-KDA)
C_6OH	2-Keto-3-deoxy-hexonsäure (KDG)
C_9OH	2-Keto-3-deoxy-nononsäure
C_5N	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure
C_6N	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure
C_7N	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure
C_7N-2-OMe	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure-ß-methylglykosid
C_9N	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-nononsäure (NeuNAc; N-Acetyl-neuraminsäure)

Die C-Indizes geben jeweils die Länge der Kohlenstoff-Kette an.

C. THEORETISCHER TEIL

C. I. Einführung

Zum qualitativen Nachweis der individuellen Zucker aus biologischem Material ist eine große Anzahl sehr unterschiedlicher Agenzien in Gebrauch. Ihre Reaktionen beruhen auf der Reduzierbarkeit der Carbonyl-Funktion (25), der Spaltung vizinaler Hydroxyl-Gruppen (153) und auf Farbreaktionen (169). Durch Kondensation von Abbau-Produkten der Zucker im alkalischen und mineral-sauren Milieu können häufig mit organischen Verbindungen - Thiolen, Harnstoffderivaten, Phenolen, aromatischen Aminen und heterocyclischen Verbindungen - charakteristische Farbstoffe gebildet werden.

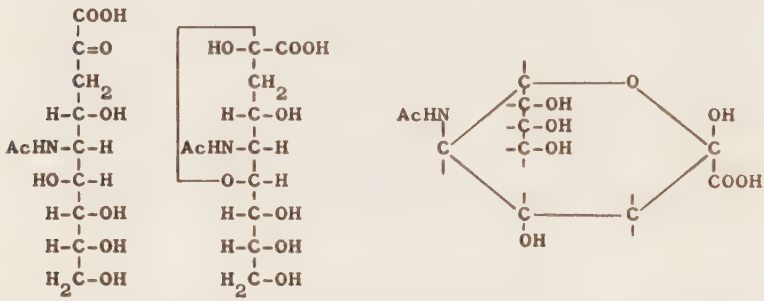
Im Falle der Anwendung einer beliebigen Farbreaktion für ein unbekanntes Material sind Überlegungen hinsichtlich der Spezifität von Bedeutung: Es muß betont werden, daß keine einzige kolorimetrische Bestimmungsmethode absolut spezifisch ist. Die Identifizierung eines unbekannten Zuckers kann daher nur glaubwürdig sein, wenn wenigstens eine weitere, unabhängige Bestimmungsmethode zu einem gleichlautenden Ergebnis führt. Andererseits kann der Aussagewert einer Farbreaktion wesentlich steigen, wenn der Mechanismus der Chromogen-Bildung und das entstandene Chromophor-Molekül bekannt sind.

Es ist verständlich, daß Kohlenhydrate, die sich nur in ihrer Stereochemie voneinander unterscheiden, auch weitgehend zu gleichen Abbau-Produkten führen. Folglich sind die meisten Farbreaktionen vornehmlich Nachweise für Substanzgruppen wie z.B. Tetrosen, Pentosen, Hexosen, Hexosamine oder Uronsäuren.

Für die Neuraminsäure und ihre Derivate ist ein breites

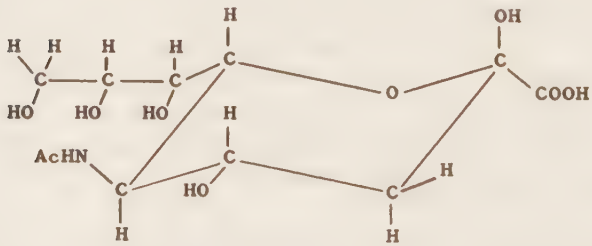
Spektrum von Farbreaktionen bekannt geworden. Denn mit ihren unterschiedlichen Funktionen läßt sie sich in mehrere Substanzgruppen einordnen: Zuckersäure, Deoxyketose, Acetamidozucker.

Abb. 1 N-Acyl-neuraminsäure in den üblichen Schreibweisen



Keto-Form Ring-Form

nach Fischer nach Haworth



nach Reeves

Von den vielen möglichen Nachweisen für Neuraminsäure haben sich in den letzten 2o Jahren in der Glykoprotein-

und Gangliosid-Forschung vor allem folgende drei Bestimmungsmethoden - verschiedentlich modifiziert - eingebürgert:

a) Ehrlich Reaktion (p-Dimethylamino-benzaldehyd in saurem Milieu)
b) Bial/Svennerholm Reaktion (Orcin/Resorcin in halbkonzentrierter Salzsäure)
c) Aminoff/Warren Reaktion (Perjodsäure-Oxidation und nachfolgende Kondensation mit Thiobarbitursäure)

Die Chromogen-Bildung und damit die Spezifität dieser Reaktionen zu untersuchen, ist Ziel dieser Arbeit.

C. II. Entdeckung und Isolierung der Neuraminsäure

"Es wurde eine Substanz erhalten, welche mit Orcin und eisenchloridhaltiger Salzsäure eine rotviolette Farbreaktion gibt und bei der Hydrolyse mit 16 proz. Schwefelsäure tiefschwarze Flocken abscheidet. Ein Körper mit diesen Eigenschaften findet sich auch im Gehirn."

Mit diesen Worten faßt Walz (157) aus dem Institut von Thierfelder 1927 das besondere Ergebnis seiner Untersuchungen über das Vorkommen von Kerasin in der normalen Rindermilz zusammen. Die gleichen Beobachtungen machen Levene und Landsteiner (108) an einer Lipoidfraktion aus Pferde- und Rindernieren und aus Rindergehirn.

Im Jahre 1935 findet Klenk (29) bei seinen Arbeiten auf dem Gebiet der Lipoidstoffwechsel-Krankheiten ein Lipoid, das er vorerst als Substanz X bezeichnet. Diese Substanz kann in geringer Menge aus dem Gehirn eines Falles der Niemann-Pickschen-Krankheit isoliert werden. Sie wird aus dem Rohsphingosin abgetrennt. Diese zuckerhaltige Substanz X unterscheidet sich von den gleichfalls zuckerhaltigen Cerebrosiden durch gute Wasserlöslichkeit, sauren Charakter und Zersetzung bei der hydrolytischen Spaltung. Außerdem gibt sie mit dem Orcin-Reagenz eine rotviolette Farbe, während die Cerebroside sich grün färben. Eine ähnliche Verbindung befindet sich in geringer Menge in der Protagonfraktion des Normalhirns. In Fällen von amaurotischer Idiotie (Typ Tay-Sachs) ist sie in besonders reichlichen Mengen vorhanden (8o)(81). Zur näheren Charakterisierung dieses Lipoids kann Klenk (82) 1941 durch Anwendung seiner Spaltungsmethode mit methanolischer Salzsäure diese Aussagen machen: Es enthält Fettsäuren, Sphingosin, Galaktose und eine bisher unbekannte stickstoffhaltige, organische Säure. Für die neue Polyhydroxy-aminosäure schlägt Klenk den Namen Neuraminsäure vor. Die charakteristische, rot-

violette Farbe des "Gangliosid" benannten Lipoids mit dem Orcin-Reagenz und die Huminbildung sind auf diese Säure zurückzuführen. Sie enthält eine Carboxyl-Gruppe, eine freie Amino-Gruppe und zeigt sich stabil gegen Alkali-Behandlung. Die Analysenwerte lassen die Zusammensetzung $C_{11}H_{21}NO_9$ erwarten (83). Unter der Annahme, daß durch die Methanolyse ein Methylglykosid gebildet worden ist, wird folglich die isolierte Substanz mit "Methoxyneuraminsäure", der Grundkörper mit "Neuraminsäure" bezeichnet. Mit Hilfe der kristallisierten, reinen Methoxyneuraminsäure kann sogleich (89) eine Mikromethode zur quantitativen, kolorimetrischen Bestimmung der Neuraminsäure entwickelt werden, was sich für die weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet als eminent gewinnbringend erweist.

Auch Blix (17) berichtet 1938 über eine Lipoid-Fraktion (aus Rinderhirn isoliert), die bei Säure-Behandlung zu Huminkörpern zerstört wird und mit dem Orcin-Reagenz rotviolette Lösungen ergibt. Besonders wichtig erweist sich aber, daß diese Substanz zusätzlich die indirekte wie auch die direkte Ehrlich Reaktion zeigt (42). Blix kann auf Grund dieser Tatsache eine Beziehung herstellen zu dem schon 1936 (16) von ihm selbst isolierten "sauren Kohlenhydrat I" aus Submaxillaris-Mucin: Mit dem DMAB-Reagenz von Ehrlich tritt auch ohne Alkali-Vorbehandlung eine starke Rotfärbung ein. Die Orcin-Salzsäure Reaktion zeigt ebenfalls die rotviolette Farbe wie bei den oben erwähnten Lipoid-Substanzen. Blix und Mitarbeiter (22)(23) nehmen an, daß in den Gangliosiden, ebenso wie im Submaxillaris-Mucin eine disaccharidartige Substanz - Sialinsäure (sialic acid) genannt - vorkommt (Zusammensetzung $C_{14}H_{23}NO_{11}$), die aus N-Acetyl-glucosamin und einer Polyoxysäure mit sechs Kohlenstoffatomen zusammengesetzt ist. Dies kann von Klenk (84) widerlegt werden, da das N-Acetyl-glucosamin als ein Bestandteil der Ganglioside, nicht aber der Neuraminsäure zu finden ist.

Hingegen bestätigen Klenk und Lauenstein (90) die von Blix wiederholt ausgesprochene Vermutung, daß die im Submaxillaris-Mucin enthaltene Kohlenhydrat-Gruppe und anscheinend auch viele andere mit der der Ganglioside identisch sein könnte. Aus Submaxillaris-Mucin isolieren sie die Neuraminsäure in Form ihrer Methoxyl-Verbindung und darüber hinaus auch aus Harn-Mucin. Letzteres erweist sich von besonderer Bedeutung, weil Gottschalk (54) aus Ovomucin und Harnmucin durch Einwirkung von Influenza-Virus eine Substanz abspaltet, die sich in mancher Hinsicht wie Neuraminsäure verhält. Sie wird von Gottschalk jedoch zunächst als Pyrrolin-pentose bzw. als ein Derivat der α-Pyrrolcarbonsäure angesprochen.

Die hämagglutinierende Wirkung des Virus wird durch Mucine stark gehemmt. Der hemmende Einfluß verschwindet mit der enzymatischen Abspaltung eines niedermolekularen Bausteins, weshalb dieser auch als determinierend für die Eigenschaft des Virus-Rezptors angesehen werden kann.

Die Zusammenhänge zwischen der Methoxyneuraminsäure, der Blix'schen Sialinsäure und dem Gottschalk'schen Virus-Receptor (55) werden 1954 von Klenk und Faillard (85) sowie von Klenk, Faillard und Lempfried (86) geklärt: Durch die Isolierung der N-Acetyl-neuraminsäure (NeuNAc) aus Submaxillarismucin nach milder Säurehydrolyse und aus Harnmucin nach Einwirkung von Influenza-Viren ist der native Baustein gefunden. Methanolyse liefert aus NeuNAc die Methoxyneuraminsäure.+

+ Weitere Synonyme für die NeuNAc sind:
Lactaminsäure (Kuhn u. Brossmer (95)),
Hemataminsäure (Yamakawa u. Suzuki (171)),
Gynaminsäure (Zilliken et al. (172)),
O-Sialinsäure (Blix et al. (21)).

Während heute mannigfaltige Identifizierungsmöglichkeiten wie Chromatographie, Elektrophorese und Spektralanalyse zur Verfügung stehen,ist der Weg vom Auffinden zur erfolgreichen Isolierung der N-Acetyl-neuraminsäure im wesentlichen nur auf Grund der Farbreaktionen mit Orcin-Salzsäure und DMAB zu beschreiten gewesen.

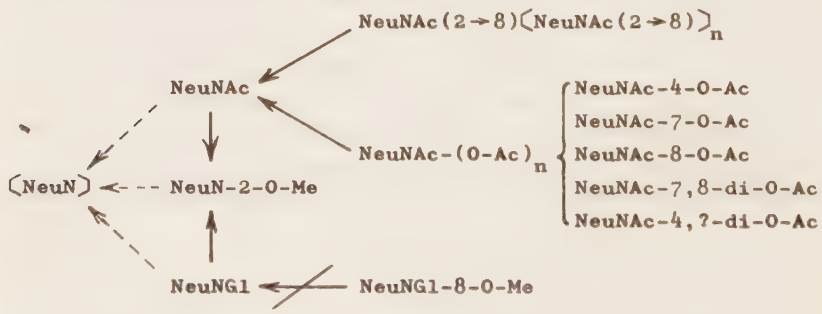
C. III. Chemie der Neuraminsäure

Die weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet führen zum Auffinden verschiedenartig substituierter Neuraminsäuren, zur Struktur-, Konfigurations- und Konformations-Aufklärung und schließlich zur chemischen Vollsynthese.

1. Natürliche Derivate

Die Heterogenität der Acylneuraminsäuren im biologischen Material ist vor allem in den Arbeitskreisen um Blix, Klenk und Faillard aufgezeigt worden. Zur Nomenklatur ist vereinbart (18), daß der Grundkörper als Neuraminsäure und alle natürlichen Derivate als Sialinsäuren bezeichnet werden. Im folgenden wird die neueste, genau definierende Nomenklatur verwendet (vgl. Abb. 2) und auf den viele Derivate umfassenden Begriff "Sialinsäure" verzichtet.

Abb. 2 Neuraminsäure: Grundkörper und Derivate



Das Schaf-Submaxillarismucin enthält nach Blix et al. (2o) (21) ausschließlich NeuNAc (O-Sialinsäure)+, das Rinder-Mucin hauptsächlich NeuNAc-7-O-Ac (B-Sialinsäure), das

+Blix'sche Nomenklatur in Klammern

Schweine-Mucin NeuNGl (P-Sialinsäure) und das Pferde-Mucin NeuNAc-4-O-Ac (E-Sialinsäure). Weitere Untersuchungen (88) (43) führen jedoch zu dem Ergebnis, daß die Zuordnung der einzelnen Neuraminsäure-Derivate zu ihrer Herkunft nicht generell zulässig ist. Nach den bisherigen Kenntnissen findet sich nur im menschlichen Material - gleich welcher Herkunft - die NeuNAc als einzige N-Acyl-neuraminsäure. Im Rinder-Mucin sind als weitere N-Acyl-neuraminsäuren gefunden worden: NeuNAc, NeuNGl, NeuNAc-7,8-di-O-Ac (Blix und Lindberg (19)) und NeuNAc-8-O-Ac (Schauer u. Faillard (141)). Als einziges Derivat der N-Glykolyl-neuraminsäure ist nur eine NeuNGl-8-O-Me von Warren (162) im Seestern "Asterias forbesi" aufgefunden worden. O-Acylierte N-Glykolyl-neuraminsäure, wie sie von Gibbons (49) diskutiert wird, scheint nicht zu existieren (Schoop u. Faillard (142)), ebensowenig O-glykolylierte N-Acetyl-neuraminsäure. Hingegen ist die Gruppe der N-Acetyl-neuraminsäuren noch bereichert um oligomere und polymere Formen: In den Gangliosiden (106)(47) tritt die NeuNAc als Di- und Trisaccharid auf, untereinander über eine 2 - 8 Bindung verknüpft. Barry und Goebel (8)(7) entdecken im Kulturfiltrat von Escherichia coli K-235 Homopolymere der NeuNAc, die ebenfalls 2 $\rightarrow$ 8 ketosidisch miteinander verbunden sind.

Vom nicht existenzfähigen, hypothetischen Grundkörper "Neuraminsäure" (52) leitet sich ein Spektrum von Derivaten ab. Sie sind alle durch Methanolyse nach Klenk (82) in das Neuraminsäure-methylglykosid "Methoxyneuraminsäure" zu überführen, die NeuNGl-8-O-Me in den entsprechenden 8-O-Methyläther des Glykosids.

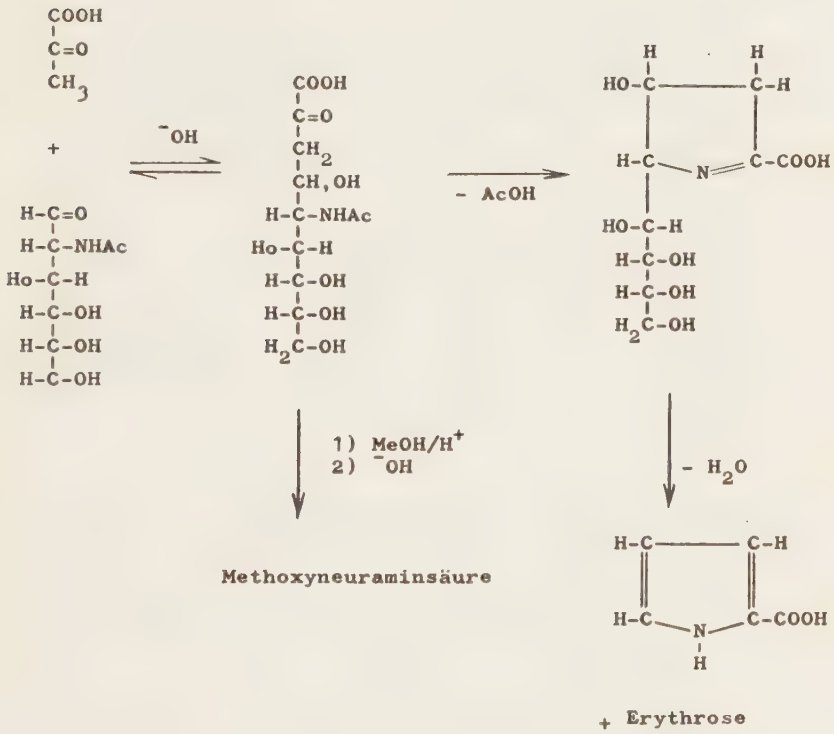
2. Strukturaufklärung

Das Auffinden so unterschiedlicher Derivate der Neuraminsäure erschwert ihre Strukturaufklärung beträchtlich. Während über die funktionellen Gruppen - eine titrierbare reduzierende Gruppe, eine Carboxyl-Gruppe, eine N-Acyl-Gruppe, fünf Hydroxyl-Gruppen - bald Einigkeit herrscht (21)(87), ergeben die unterschiedlichen Ergebnisse der Stickstoffbestimmung keinen eindeutigen Hinweis auf die richtige molekulare Zusammensetzung. Die durch Alkali-Behandlung der NeuNAc als Abbau-Produkt erhaltene α-Pyrrolcarbonsäure (Hiyama (70), Gottschalk (55)(56)(57), Klenk u. Faillard(85)) und ihre Synthese aus Hexosamin und Brenztraubensäure durch Aldolkondensation (Gottschalk (58)(60) stellt ein definiertes, bekanntes Produkt dar. Gottschalk erkennt daraus 1956 die NeuNAc als Aldolkondensations-Produkt aus N-Acetyl-glucosamin und Brenztraubensäure, stellt die Strukturformel auf und gibt Mechanismen zur Entstehung von Methoxyneuraminsäure und α-Pyrrolcarbonsäure an (vgl. Abb. 3). Wichtige an der N-Acetyl-neuraminsäure beobachtete chemische Reaktionen finden ihre Erklärung.

Auch über die Retro-Aldolisierung der N-Acetyl-neuraminsäure zu N-Acetyl-glucosamin und Pyruvat können Kuhn und Brossmer (96) und Zilliken und Glick (173) berichten. Heimer und Meyer (65) beschreiben sogar den entsprechenden enzymatischen Abbau der NeuNAc, und Cornforth et al. (34)(36) gelingt die chemische Synthese aus Oxalacetat (aktives Pyruvat) und N-Acetyl-glucosamin (vgl. C.III.3.).

Die Stereochemie der Neuraminsäure bereitet jedoch weitere Schwierigkeiten: Comb u. Roseman (31) finden durch Einwirkung einer Aldolase aus Clostridium perfringens auf NeuNAc als Spaltungsbruchstücke N-Acetyl-mannosamin anstelle von N-Acetyl-glucosamin und Pyruvat. Die früheren Befunde finden ihre Erklärung in der leichten Epimerisierung

Abb. 3 N-Acyl-neuraminsäure, Entstehung und Reaktionen nach Gottschalk

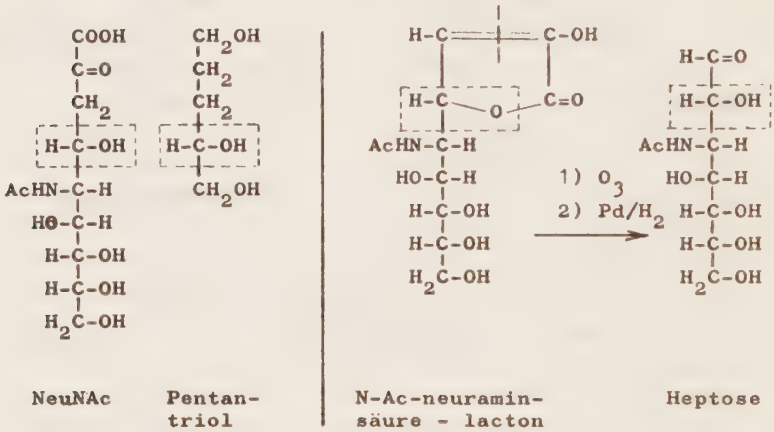


N-Acetyl-glucosamin ⇌ N-Acetyl-mannosamin im alkalischen Milieu (98)(32). Während die chemische Synthese (26) sowohl aus N-Acetyl-glucosamin wie auch aus N-Acetyl-mannosamin gelingt, ist die Biosynthese mit Hilfe der Aldolase (33) nur aus N-Acetyl-mannosamin möglich. Folglich entspricht die Kofiguration an C-5 bis C-8 der des N-Acetyl-mannosamins.

Die Konfiguration der C-4 OH-Gruppe können Kuhn und Mitarbeiter (93)(99) aufklären durch Abbau der Neuraminsäure

zu R(-)-Pentan-1,4,5-triol, bzw. durch Ozonabbau des α,ß-ungesättigten Neuraminsäurelactons zur konfigurativ gesicherten 3-Acetamido-3-deoxy-D-manno-heptose. (vgl.Abb.4)

Abb. 4 Zur Konfiguration der C-4 OH-Gruppe der Neuraminsäure nach Kuhn und Mitarbeiter

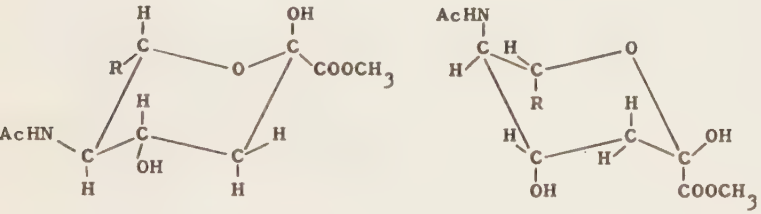


Die frühere Zuordnung der C-4 OH-Gruppe zur L-Konfiguration (97), die auf Grund der Hudsonschen Lactonregel aufgestellt war, ist daraufhin nicht haltbar.

Andererseits bestätigen Lutz et. al. (111) die neue Zuordnung und außerdem auch die ß-Konfiguration der anomeren OH-Gruppe an C-2, die Kuhn und Brossmer (97) zur Erklärung der aufwärts gerichteten Mutarotation (von -115° nach -24°) der kristallisierten NeuNAc in DMSO gefordert haben. Eine Reihe von Pyranosen weisen im NMR-Spektrum Fernkopplungen zwischen der anomeren OH-Gruppe und den Protonen am benachbarten C-Atom auf (76). Dabei muß die Anordnung von OH-Gruppe zu Proton diaxial sein. Auch bei dem N-Acetyl-neuraminsäure-methylester findet man eine derartige Fern-Kopplung von 2,1 Hz und muß daher für die anomere OH-Gruppe die

axiale Anordnung voraussetzen. Dieser Befund, zusammen mit den aus den normalen Kopplungskonstanten abgeleiteten Diederwinkeln der Protonen an C-3 und C-4, ist nur mit der 1C-Konfiguration nach Reeves in Einklang zu bringen.

Abb. 5 Konformation des N-Acetyl-neuraminsäure-methylesters in DMSO / C_6D_6
R = $-CHOH-CHOH-CH_2OH$



1C - Konformation C1 - Konformation

Zugleich folgt aus diesen Untersuchungen unabhängig von den auf NeuNAc angewandten klassischen Methoden der Stereochemie (s.o.), daß die OH-Gruppe an C-4 in der Fischer-Projektion nach rechts und die Acetamido-Gruppe an C-5 nach links zu schreiben ist.

Unter NeuNAc versteht man demnach die ß-D(-)-5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galakto-nonulosaminsäure. Die Nomenklatur ß-D bezieht sich auf die Konfiguration des letzten asymmetrischen Kohlenstoffs der C-9-Kette. Legt man die Substitution an C-6 des Pyranose-Ringes zugrunde, so handelt es sich bei der NeuNAc um einen L-Zucker. Die anomere OH-Gruppe muß dann als α-ständig angesprochen werden. Diese Nomenklatur ist jedoch unvorteilhaft, da z.B. Ketohexopyranosen nicht mit ihr beschrieben werden können.

Auch über die Stereochemie der früher beschriebenen synthetischen Ketoside (116)(104)(45) kann nun nach Kenntnis

der Anordnung der anomeren OH-Gruppe der NeuNAc mit Hilfe folgender unabhängiger Gesetzmäßigkeiten eine eindeutige Aussage gemacht werden:

a) Eine OH-Gruppe am Anomerie-Zentrum von Zuckern hat denselben Drehsinn, aber einen kleineren Drehwert als eine O-R-Gruppierung.
b) Bei der Glykosidsynthese nach Königs/Knorr tritt stets Konfigurationsumkehr am anomeren C-Atom ein.

Was die Glykosid-Bindung im biologischen Material betrifft, so bildet die hohe Stereo-Spezifität von Enzymen die Brücke: Das in Myxoviren und bakteriellen Kulturfiltraten befindliche Enzym "Neuraminidase" spaltet von den anomeren synthetischen Glykosiden der Acylneuraminsäuren nur die α-Form. Somit ist leicht über eine Zuordnung zu entscheiden:

NeuNAc und alle anderen Derivate der Neuraminsäure sind α-ketosidisch gebunden an Galaktose oder Galaktosamin. Sie besetzen eine nicht-reduzierende, terminale Position. Die unter C.III.1. beschriebenen polymeren Strukturen sind die einzigen Ausnahmen.

3. Chemische Synthesen

Noch lange bevor die genaue Konfiguration der NeuNAc bekannt ist, gelingt Cornforth et al. (34)(36) die erste Synthese durch Kondensation von N-Acetyl-glucosamin mit Oxalessigsäure in 2-proz. Ausbeute. Der glückliche Umstand der Epimerisierung des Acylhexosamins (vgl. S. 1o/11) eröffnet den Weg zu einem mit der isolierten Verbindung völlig identischen Produkt. Durch Einsatz von N-Acetyl-mannosamin kann die Ausbeute zwar auf 1o % d.Th. erhöht werden (29), doch Kuhn und Baschang (94) gelingt durch Wahl geeigneter Derivate der Kopplungskomponenten, nämlich 4,6-Benzyliden-N-acetyl-glucosamin und Oxalessigsäure-di-tert.-butylester, eine entscheidende Ausbeutesteigerung auf 34 % d.Th.

Unter Anwendung des gleichen Syntheseprinzips werden weitere synthetische N-Acyl-Derivate erhalten:

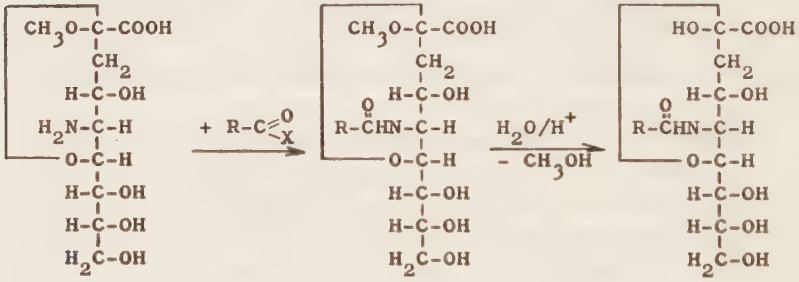
NeuNGl	(Faillard u. Blohm (44))
NeuNCbo	(Gielen (51))
NeuN-Carbäthoxy	(Wesemann u. Zilliken (167))
NeuN-Benzoyl	"
NeuN-Propionyl	(Meindl u. Tuppy (117))
NeuN-Butyryl	"

Da zum Studium der Biochemie der NeuNAc radioaktive Verbindungen als Tracer wünschenswert sind, ist auch in dieser Richtung erfolgreich gearbeitet worden: Mit Hilfe von NeuNAc-Aldolase (27) oder einem aus Rattenleber, bzw. Submaxillaris-Drüsen erhaltenen Enzym-System (163) wird N-(1-^{14}C) Acetyl-mannosamin mit Phosphoenolpyruvat zu N-(1-^{14}C)Acetylneuraminsäure kondensiert. Die chemische Synthese nach Kuhn und Baschang (94) führt jedoch zu hohen Ausbeute-Verlusten im Hinblick auf das radioaktive Material.Deshalb schlagen Wesemann u. Zilliken (167) die hydrogenolytische Acetylierung der NeuNCbo vor. Ein allgemeiner anwendbares Verfahren zur Darstellung von N-Acyl-neuraminsäuren geben Wirtz-Peitz,

Schauer u. Faillard (170) an.

Die leicht zu isolierende Methoxyneuraminsäure (NeuN-2-O-Me) wird mit Essigsäure-anhydrid, O-Carboxy-glykolsäure-anhydrid oder (1-^{14}C) Essigsäure-anhydrid N-acyliert und die entsprechende N-Acyl-neuraminsäure durch nachfolgende schonende Glykosidspaltung freigesetzt. Die dabei erzielten Ausbeuten liegen - bezogen auf eingesetzte Methoxyneuraminsäure wie auch auf Acylierungs-Reagenz - bei 8o % d.Th.

Abb. 6 Synthese von N-Acyl-neuraminsäure aus Methoxyneuraminsäure



C. IV. Bestimmungsmethoden

Die Acylneuraminsäuren - als Substitutions-Derivate des Grundbausteins Neuraminsäure - lassen sich nach mehreren Methoden erfassen, die in drei Klassen einzuteilen sind:

a) Methoden, die den Gesamt-Neuraminsäure-Gehalt bestimmen. Sie enthalten im Reaktionsmedium starke Säure, die die Freisetzung der Acylneuraminsäuren aus der glykosidischen Bindung bewirken. Zu diesen sind zu zählen:

Tryptophan / Salzsäure	(46)(143)
Orcin / Salzsäure	(89)(151)(166)
Resorcin /Salzsäure	(152)
DMAB / Salzsäure	(166)
Diphenylamin / Schwefelsäure	(126)
Essigsäure / Schwefelsäure	(68)

b) Methoden, die die freien Acylneuraminsäuren erfassen. Sie benötigen also eine vorangehende enzymatische oder chemische Hydrolyse der glykosidischen Bindung:

Perjodat / Thiobarbitursäure	(161)(2)(3)
Alkali / Ehrlich	(3)

c) Methoden, die nicht auf Farbreaktionen beruhen wie die voranstehenden, sondern bei denen man sich eine Gasentwicklung zunutze macht:

CO_2 - Bestimmung	(155)(21)(78)
CO - Bestimmung	(121)(21)

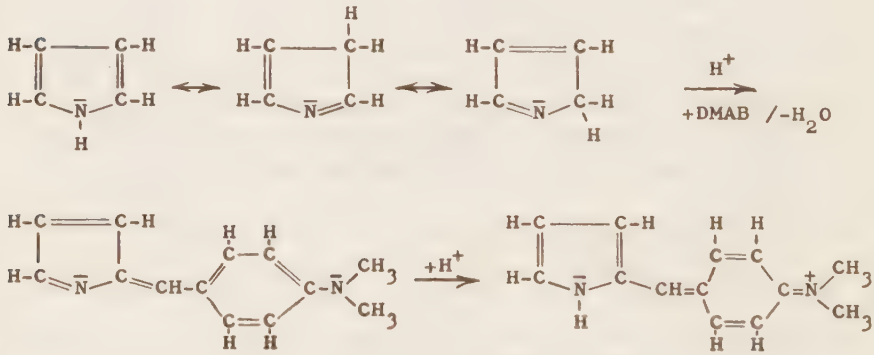
Die gebräuchlichsten Bestimmungsmethoden sind die folgenden: DMAB / Salzsäure, Orcin bzw, Resorcin / Salzsäure, Diphenylamin / Schwefelsäure und Perjodat / Thiobarbitursäure Reaktion.

1. Ehrlich Reaktion

a) Direkte Ehrlich Reaktion

Pathologischer Harn und in geringem Maße auch normaler Harn färben sich nach Beobachtungen von Ehrlich (41) und Prösch^e^r (135) mit DMAB / Salzsäure purpur-rot. Diese Reaktion ist auf Pyrrole, die vom Urobilinogen herrühren, zurückzuführen: Freie α- oder ß-Methylengruppen der tautomeren Formen kondensieren mit dem aromatischen Aldehyd zu Pyrrámethenen, die stabile Farbstoffe darstellen.

Abb. 7 Farbstoffbildung mit dem Ehrlich'schen Aldehyd



Die Faktoren, welche die Konzentration des entstehenden Kondensationsproduktes beeinflussen, sind von Treibs und Herrmann (156) untersucht worden. Es sind dies: die Substitution des Pyrrolringes, die Säurekonzentration, das Lösungsmittel und die Reaktiontemperatur. Daß auch die Acylneuraminsäuren einen purpur-roten Farbstoff ergeben, ist offensichtlich auf die primäre Bildung eines Pyrrol-Chromogens zurückzuführen (Mechanismus der Reaktion (C.V.2.).

Für die quantitative Bestimmung der Acylneuraminsäuren - in Abwesenheit von Pyrrolen - mit Hilfe dieser Methode haben Werner u. Odin (166) folgendes Verfahren aufgestellt:

> 5 ml Neuraminsäure - haltige Lösung werden mit 1 ml Ehrlich Reagenz (5 g DMAB in 5o ml Wasser + 5o ml HCl_{Konz}) versetzt. Im verschlossenen Röhrchen wird die Mischung 3o Min. auf 1oo°C gehalten, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 565 mμ photometrisch analysiert.

Diese "Direkte Ehrlich Reaktion" unterscheidet sich von den zwei weiteren Reaktionen mit DMAB (Ehrlich-Aldehyd), die unter den Namen Morgan-Elson Reaktion und Elson-Morgan Reaktion bekannt sind.

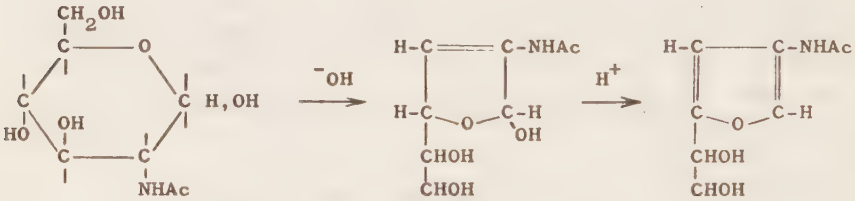
b) Morgan-Elson Reaktion (Indirekte Ehrlich Reaktion)

Nach Ehrlich (41) und Müller (124) reagieren viele Mucine bzw. peracetylierte Hexosamine mit dem salzsauren DMAB - Reagenz positiv, nachdem sie zuvor - im Gegensatz zu den Pyrrolen - mit verdünntem Alkali vorbehandelt worden sind (daher auch "Indirekte Ehrlich Reaktion"). Der Farbstoff ist jedoch nicht vergleichbar stabil, und er zeigt weiterhin ein Doppelmaximum (545 mμ und 585 mμ). Auch aus dieser Beobachtung sind Methoden zur quantitativen Bestimmung erarbeitet worden (174)(4), von denen die von Morgan u. Elson (123) die erste brauchbare und die von Reissig et al. (138) die heute gebräuchlichste ist:

> 0,5 ml Testlösung wird mit o,1 ml 0,8 M Kaliumtetraborat-Puffer (pH 9,2) genau 3 Min. auf 100°C erhitzt und sofort auf 15 °C abgekühlt. Dann werden 3 ml DMAB-Reagenz (1o g DMAB gelöst in einem Gemisch aus 12,5 ml 1o n HCl und 87,5 ml Eisessig) hinzugegeben, 2o Min. auf 37°C erwärmt, auf 15°C abgekühlt und unverzüglich bei 585 mμ photometriert.

Kuhn und Krüger (1o1)(1o2) haben den Mechanismus der Chromogen-Bildung aufgeklärt. Unter schwach alkalischen Bedingungen werden die 2-Acetamido-hexosen teilweise zu Anhydro-Zuckern umgewandelt, die dann unter den sauren Bedingungen des DMAB- Reagenzes Furan-Derivate ergeben (1o7). Anschliessend erfolgt die Kondensation in Analogie zum Pyrrol.

Abb. 8 Chromogen - Bildung der acylierten Aminozucker nach Kuhn und Krüger



c) Elson-Morgan Reaktion

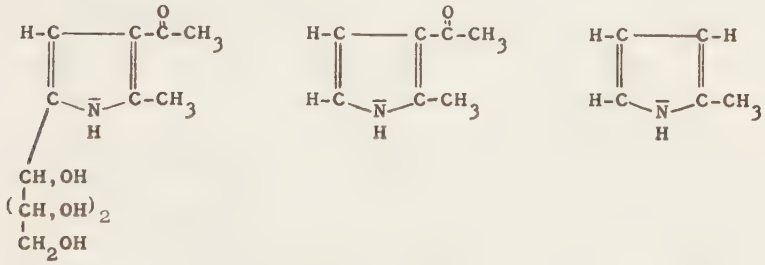
Die dritte bekannte Reaktion mit dem DMAB-Reagenz ist zur Bestimmung von nicht-acylierten Hexosaminen geeignet. Sie erfordert ebenfalls eine Vorbehandlung. Durch Kondensation von ß-Diketonen mit Hexosaminen in alkalischen Puffern entstehen nach Elson u. Morgan (42) Pyrrol-Derivate, die dann mit DMAB zu roten Farbstoffen Kondensieren. Im Neuraminsäure - Molekül ist ein ähnlicher erster Schritt bereits teilweise vorweg vollzogen: An die Carbonyl-Gruppe des Acylhexosamins ist Brenztraubensäure kondensiert, so daß zur Ausbildung eines Pyrrolkörpers nur noch der Ringschluß zwischen der C-2 Carbonyl-Gruppe und dem Stickstoff an C-5 erforderlich ist (vgl. Abb. 3). Die Übliche Bestimmungsmethode wird folgendermaßen durchgeführt:

Zu 1 ml Hexosamin-Lösung werden 2 ml Acetylaceton-Reagenz (1 ml Acetylaceton in 25 ml 1 n Na_2CO_3 gelöst)

gegeben und 2o Min. auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 6 ml Äthanol und 1ml Ehrlich-Reagenz (0,8 g DMAB in 15 ml Äthanol + 15 ml $HCl_{Konz.}$) versetzt. Man erwärmt weitere 10 Min. auf 65-70°C, kühlt und mißt die optische Dichte bei 530 mμ.

Der Chromogenbildungs-Mechanismus dieser Reaktion ist noch weitgehend ungeklärt. Es sind bisher diese drei Kondensationsprodukte isoliert und identifiziert worden (42)(35):

Abb. 9 Chromogen der Elson-Morgan Reaktion

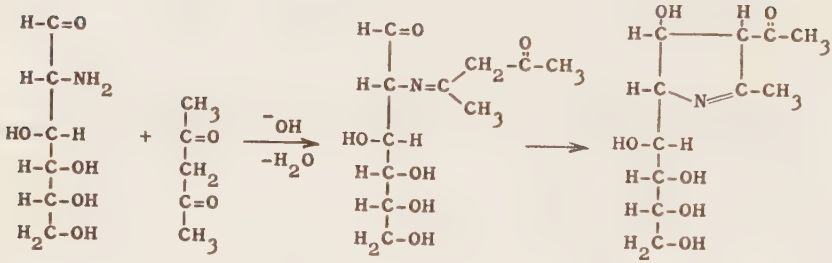


I. II. III.

Während I mit DMAB nicht reagiert und II nur eine schwache Rot-Färbung ergibt, stellt III wohl das eigentliche Chromogen dar. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, daß aus I weder der 5-Tetrahydroxybutyl-Rest noch die 3-Acetyl-Gruppe unter alkalischen Bedingungen abspaltbar ist (30).

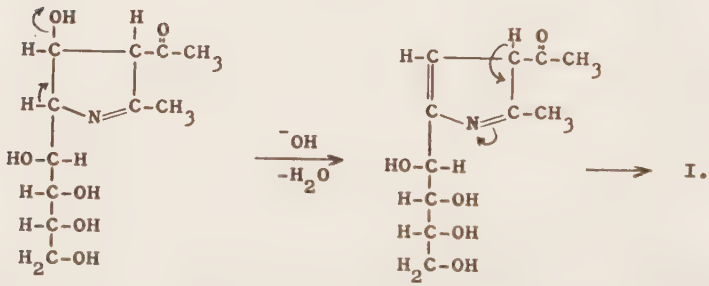
Ausgehend von dem von Cornforth und Firth (35) postulierten Zwischenprodukt kann man jedoch folgende Mechanismen zur Bildung von I, II und III als Diskussionsgrundlage annehmen:

Abb. 1o Mechanismen zur Bildung der Elson-Morgan Chromogene

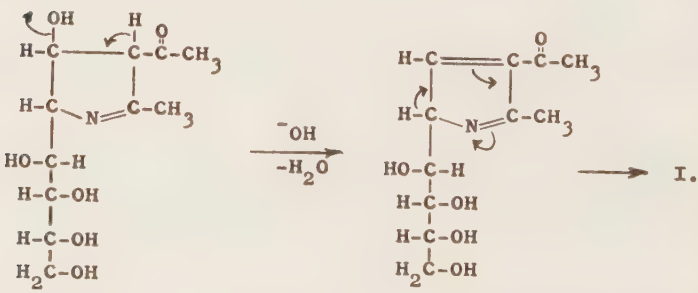


instabile Zwischenstufe

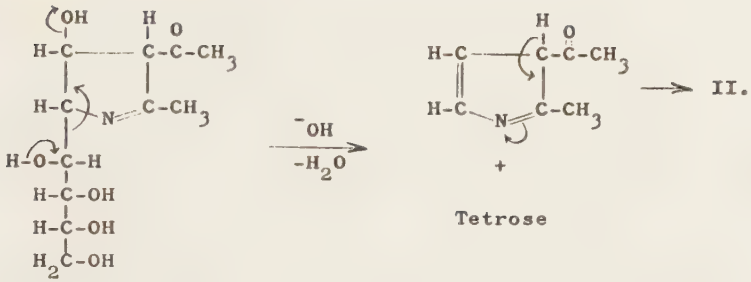
a)



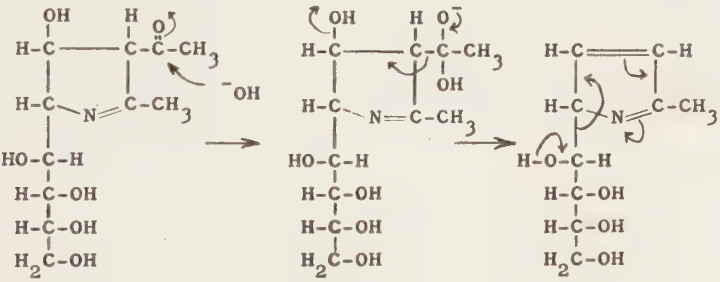
b)



c)



d)



III. + Tetrose

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Reaktion mit dem Ehrlich-Aldehyd einen Test auf Pyrrolkörper (Direkte Ehrlich Reaktion u. Elson-Morgan Reaktion) und auf Acetamido-furane (Indirekte Ehrlich Reaktion) darstellt. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß die Substituenten am Heterocyclus solche mesomeren Grenzstrukturen ermöglichen, oder induzieren müssen, die besonders eine α-Position, in untergeordnetem Maße auch eine ß-Position zum Nucleophilen Angriff auf die Carbonyl-Funktion des p-Dimethylaminobenzaldehyds (DMAB) befähigen.

2. Bial / Svennerholm Reaktion

Schon 1885 ist die Orcin/Salzsäure Reaktion von C. Reichl (136) zur Bestimmung von Pentosen in die Kohlenhydrat-Chemie eingeführt worden. Über eine wesentliche Verbesserung der Methode kann M. Bial (11)(12) berichten, da sich der grüne Farbstoff viel intensiver entwickelt, wenn $FeCl_3$, $CuSO_4$ oder HgO als "Oxidations-Mittel" zugesetzt wird. Da sich diese Reaktion auf Grund einer typischen Violett-Färbung als höchst brauchbare und recht empfindliche Methode in der Glykolipoid- und Glykoprotein-Forschung erweist, wird sie heute vornehmlich zur Bestimmung der Neuraminsäure und ihrer Derivate benutzt. Der verschiedentlich modifizierten Methode (12)(17)(89)(166) haben Böhm et al. (24) die gebräuchliche Form gegeben:

> 1 ml Probelösung wird mit 1 ml Bial Reagenz (0,1 g Orcin, 40,7 ml HCl_{Konz}, 1 ml 1proz. $FeCl_3$-Lösung, mit Wasser ad 50 ml) versetzt und genau 15 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen im Eisbad wird der Farbstoff mit 5 ml Amylalkohol ausgeschüttelt und - nach Trennen der Phasen durch Zentrifugieren - die alkoholische Lösung bei 580 mμ photometriert.

Die ausführlichste Untersuchung der Bial Reaktion stammt von Svennerholm (151). Bis auf die Reagenz-Zusammensetzung (Wiedereinführung von Cu^{++}-Salzen) erweist sich die obige Form des Tests als optimal. Jedoch wird festgestellt, daß N-Glykolyl-neuraminsäure einen ca. 20 % höheren molaren Extinktionskoeffizienten besitzt als N-Acetyl-neuraminsäure. (vgl. Tab. I)

Um den störenden Einfluß von anderen Kohlenhydraten weitgehend auszuschließen, wird von Svennerholm (152) bei der Bial Reaktion das Orcin durch eine gleiche Menge Resorcin ersetzt. Dadurch kann weiterhin die Empfindlichkeit um etwa

Tab. I Bial/Svennerholm Bestimmung:
Molare Extinktionskoeffizienten von
Neuraminsäure-Derivaten

NeuNAc	5290+	5895 } (151)	8020 } (152)
NeuNAc-O-Ac++		5798	7980
NeuNGl	6300+	7060	9545
NeuN-Propionyl			7900 } (117)
NeuN-Butyryl			5000
NeuN-Benzoyl			3340
NeuN-Cbo	5430+		
NeuN-2-O-Me	6690+		
	Orcin/Fe 100°	Orcin/Cu 106°	Resorcin/Cu 100°

+ H.Faillard u. Mitarbeiter, unveröffentlicht
++ Position der O-Ac - Gruppe nicht spezifiziert

50 % gesteigert werden, das Absorptionsmaximum verschiebt sich geringfügig nach 590 mμ.

2 ml Probelösung werden mit 2 ml Svennerholm Reagenz (0,2 g Resorcin, 80 ml HCl_{Konz}, 0,25 ml 0,1 M $CuSO_4$-Lösung, mit Wasser ad 100 ml) versetzt und wie bei der Bial Reaktion weiterbehandelt. Die alkoholische Lösung wird bei 590 mμ photometriert.

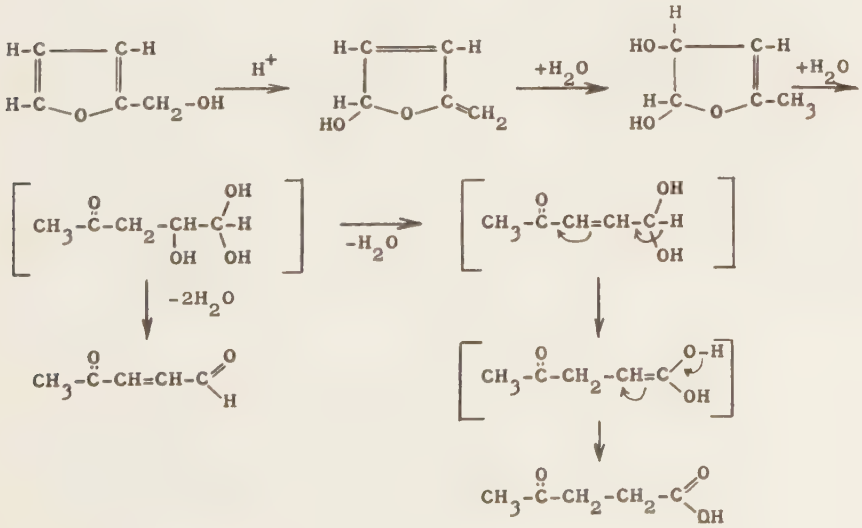
Über den Mechanismus der Farbstoff-Bildung ist so gut wie nichts bekannt. Auf Grund von Vergleichsspektren der Farbstoffe zahlreicher Kohlenhydrate bei der Bial Reaktion wird das Reagenz als spezifisch auf Furfural und Ketosen charakterisiert. In Anbetracht der zahlreichen Zwischenprodukte, die sich von Furfural und seinen Homologen unter der Ein-

wirkung starker Säuren bilden (38) hat die Aussage nur klassifizierenden Charakter. Bemerkenswert ist jedoch die Beobachtung (151)(127), daß Ketoheptosen in der Bial Reaktion nur ein Absorptionsmaximum bei 650 mμ ergeben (im Gegensatz zu allen Hexosen und Ketohexosen). Außerdem ist ihr molarer Extinktionskoeffizient sehr hoch.

3. Dische Reaktion

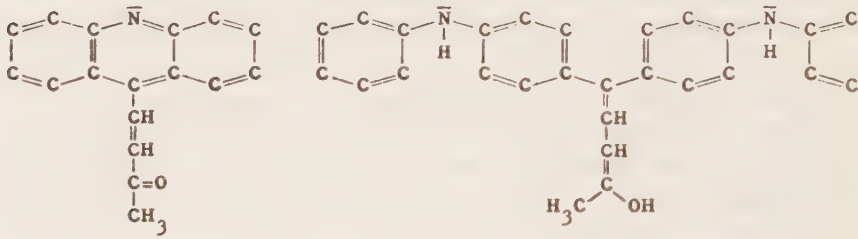
Zur Bestimmung von Deoxy-ribose hat Dische (37) das Diphenylamin - Reagenz eingeführt. Bei der Anwendung auf Serum (126) tritt - im Gegensatz zur üblichen Entwicklung eines blauen Farbstoffs - eine Purpur-Tönung auf. Diese ist auf den Gehalt der Plasmaglykoproteine an Neuraminsäure zurückzuführen (166) (68). Infolge ihrer relativen Unempfindlichkeit und geringen Spezifität wird diese Methode nur noch wenig benutzt. Es soll daher nur kurz auf den Reaktionsablauf eingegangen werden, zumal dieser weitgehend geklärt zu sein scheint. Birkofer et al. (13)(14) haben gezeigt, daß bei der sauren Spaltung von Furfurylalkohol - dem wichtigsten Säure-Abbauprodukt der 2-Deoxy-pentosen und der Keto-hexosen - mit methanolischer Salzsäure das Dimethyl-acetal des α-Methoxy-lävulinaldehyds entsteht. Dieses Produkt geht im wässrig-sauren Milieu über in ß-Acetyl-acrolein.

Abb. 11 Abbau von Furfurylalkohol zu Lävulinsäure



Der Aldehyd ist in der Dische Reaktion sehr stark positiv (λ_{max} = 600 mμ). Nach Izard et al. (73) kann es sich bei dem blauen Farbstoff nur um ein Acridin-Derivat oder Diphenylmethan-Derivat handeln (vgl. Abb. 12), entstanden aus ein bzw. zwei Molekeln Diphenylamin und einer Molekel Acetylacrolein.

Abb. 12 Mögliche Chromophore der Dische Reaktion



Acridin-Farbstoff Diphenylmethan-Farbstoff

Das Maximum der Absorption des Neuraminsäure-Farbstoffes liegt bei 515 mμ. Nach Hess et al. (69) ist das Spektrum nahezu identisch mit dem der 2-Deoxy-hexosen und dem der Hexale (λ_{max} = 53o mμ). Daraus zieht Gottschalk (59) den Schluß, daß ein ähnliches Chromogen aus N-Acetyl-neuraminsäure entstehen muß (vgl. C.V.1.). Durch Decarboxylierung (21) kommt die Neuraminsäure in der Tat der Struktur einer substituierten Deoxy-hexose sehr nahe.

4. Aminoff / Warren Reaktion

Sie stellt die am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung der freien Acylneuraminsäuren dar. Obwohl sie auch nicht ausgesprochen spezifisch ist, so hat sie doch den großen Vorteil einer sehr hohen Empfindlichkeit. Und darüber hinaus ist der zugrunde liegende Mechanismus weitgehend bekannt. Eine Besonderheit dieser Methode ist, daß ausschließlich nicht-glykosidisch -gebundene Neuraminsäure erfaßt wird.

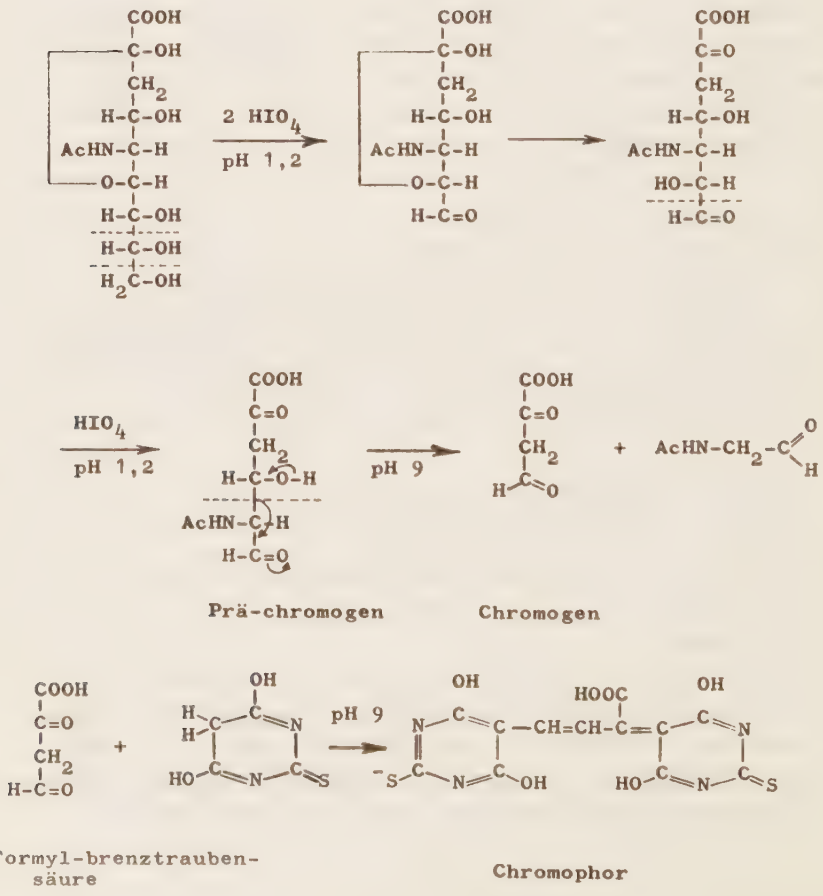
Waravdekar u. Saslaw (158)(159) haben gezeigt, daß 2-Deoxyaldosen bei der Oxidation mit Perjodat genau ein Moläquivalent Malonaldehyd ergeben. Dieser reagiert mit 2-Thiobarbitursäure zu einem Orange-Farbstoff (75) mit λ_{max} = 532 mμ. Unabhängig voneinander ist dieser Test von Weissbach und Hurwitz (165) auf 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren und von Aminoff (2)(3) und Warren (160)(161) auf Neuraminsäure übertragen worden. Dabei entsteht als Chromogen 3-Formyl-brenztraubensäure (148)(3)(103), die mit 2-Thiobarbitursäure zu einem roten Farbstoff mit λ_{max} = 549 mμ (in Cyclohexanon) und ε_{max} = 133· 10^3 reagiert. Die empfindlichsten und gebräuchlichsten Bedingungen für die Bestimmung von Neuraminsäure sind die folgenden (3):

Reagenzien:
25 mM Perjodsäure in 0,125 n H_2SO_4 (pH 1,2)
2 proz. Na-Arsenit in 0,5 n HCl
0,1 M 2-Thiobarbitursäure, mit NaOH auf pH 9 eingestellt
n-Butanol, 5 % (v/v) 12 n HCl enthaltend
Bestimmung:
0,5 ml Testlösung wird mit 0,25 ml Perjodat-Reagenz 30 Min. auf 37°C erwärmt. Dann wird mit 0,2 ml Arsenit-Lösung versetzt und ca. 2 Min. stehengelassen. 2 ml Thiobarbiturat-Reagenz werden hinzugefügt, das Gemisch genau 7,5 Min. auf 100°C erhitzt, sofort im Eisbad abgekühlt

und der Farbstoff mit 5 ml saurem Butanol extrahiert. Zur Trennung der Schichten wird kurz zentrifugiert und die Butanol-Phase bei 550 mμ photometriert. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt für NeuNAc $\varepsilon = 70{,}7 \cdot 10^3$.

Paerels u. Schut (131) Haben weitgehend den Mechanismus der Chromogen-Bildung aus Neuraminsäure und Kuhn u. Lutz (103) die Konstitution des Chromophors aufgeklärt.

Abb. 13 Chromogen-Bildung der Aminoff/Warren Reaktion



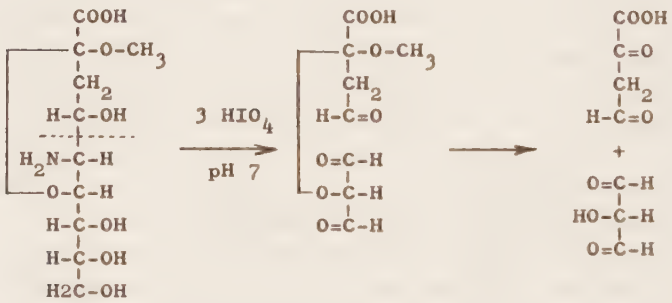
Unter Berücksichtigung einer primären schnellen und einer nachträglichen langsamen Oxidation sind damit auch die folgenden Beobachtungen bei der Anwendung dieser Methode zu erklären:

a) Substitution an C-2 stabilisiert den Pyranose-Ring und verhindert weitgehend eine Spaltung zwischen C-6 und C-7. Alle natürlichen und synthetischen Ketoside zeigen nur 3-5 % Farbstoffausbeute (116). Das sehr labile Phenyl-Ketosid (118) gibt jedoch 50 % des Wertes der nicht gebundenen Neuraminsäure.
b) Substitution an C-4, soweit es sich um eine Acyl-Gruppe handelt, ergibt keinen Unterschied zu Neuraminsäure. Im Oxidationsschritt hat der Substituent keinerlei Einfluß und im nachfolgenden chromogen- und chromophor-bildenden Schritt (pH 9, 100°) wird er leicht hydrolysiert.
c) Substitution an C-7 verhindert die Spaltung zwischen C-6 und C-7 (3)(141). Unter den Bedingungen des Oxidationsschrittes (pH 1,2 / 37°) werden O-Acyle nicht hydrolysiert.
d) Substitution an C-8 macht die Spaltung zwischen C-7 und C-8 unmöglich. Als Folge davon ist wahrscheinlich die Umwandlung Pyranose-Form / offene Form einerseits und die Oxidation zwischen C-6 und C-7 andererseits stark gehemmt. Man erhält eine verminderte Chromogen-Ausbeute: NeuNAc-8-O-Ac zeigt 47 % (141) und NeuNGl-8-O-Me zeigt 13 % (162) des normalen Wertes.
e) Substitution an C-9 hat - zumindest beim NeuN-9-P - einen deutlich negativen Effekt mit 78 % Farbstoff-Ausbeute. (140). Es tritt vermutlich eine Phosphat-Wanderung zu C-7 oder C-8 ein (pers. Mitteilung von Prof. Szabo).
f) Substitutions-Unterschiede am Stickstoff (Acetyl-, Cbo-, Propionyl-, Butyryl-) haben praktisch keinen Einfluß auf die Farbstoff-Ausbeute (117). Ungeklärt ist jedoch der große Einfluß des N-Glykolyl-Substituenten (50), der den Wert auf ca. 60 % sinken läßt.
g) Da für die Chromogen-Bildung die ersten vier Glieder der

Neuraminsäure-Kette essentiell sind, bringt jede Veränderung in diesem Teil der Molekel eine Verminderung der optischen Dichte mit sich. Säurebehandlung von ungebundener Neuraminsäure (0,1 n HCl, 100°C, 1 h ergibt 50 % Extinktionsverlust)(3)(77) und unkontrollierte Hydrolyse von Glykosiden, besonders in Gegenwart von Eisenionen, führt zu derartigen noch unbekannten Änderungen (110).

h) Methoxyneuraminsäure (NeuN-2-O-Me) ist unter den Bedingungen der angegebenen Methode negativ, obwohl eine Perjodat-Spaltung zwischen C-4 und C-5 mit nachfolgender Acetalspaltung zu ß-Formyl-brenztraubensäure eintreten sollte.

Abb. 14 Chromogen aus Methoxyneuraminsäure (NeuN-2-O-Me) durch Perjodat-Oxidation



In der Tat läuft diese Reaktion unter neutralen Bedingungen ab (131), nicht aber in dem üblichen sauren Milieu. Dort verhindert die Protonierung der Amino-Gruppe die erwartete Perjodat-Spaltung.

Wie schon betont reichen viele Nachweismethoden auf Grund ihrer geringen Spezifität nicht aus zur eindeutigen Identifizierung von Substanzen. Wie Gielen (53) gezeigt hat, ist dieser Tatsache nicht genügend Beachtung geschenkt worden

von Autoren (114)(128), die über das Vorkommen von Neuraminsäure in Pflanzen berichten. Ihre Aussage stützt sich ausschließlich auf Farbreaktionen und nicht auf die Isolierung von Acylneuraminsäuren. Bei gleichzeitiger Verwendung der beschriebenen Methoden, die wohl alle jeweils auf einem anderen Prinzip beruhen, sollte sich Neuraminsäure eindeutig feststellen lassen.

C. V. Transformation und Degradation der Neuraminsäure

Trotz der Kenntnis der molekularen Zusammensetzung und der endgültigen Struktur der Neuraminsäure bleiben neben den biochemischen Reaktionen noch eine Reihe chemischer Probleme zu klären. Es sind dies insbesondere der alkalische und der saure Abbau. Denn darauf beruhen die zuvor beschriebenen üblichen Nachweis-Reaktionen.

1. Literaturübersicht

Die Stabilität der verschiedenen Neuraminsäure-Derivate in Abhängigkeit von den pH-Bedingungen und der Temperatur sowie die Ermittlung von Reaktionsprodukten ist erstmals von Berggård u. Odin (10) mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie und der UV-Absorption untersucht worden (vgl. Abb. 15 u. 16).

Abb. 15 Abbau von NeuNAc in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Berggård u. Odin)

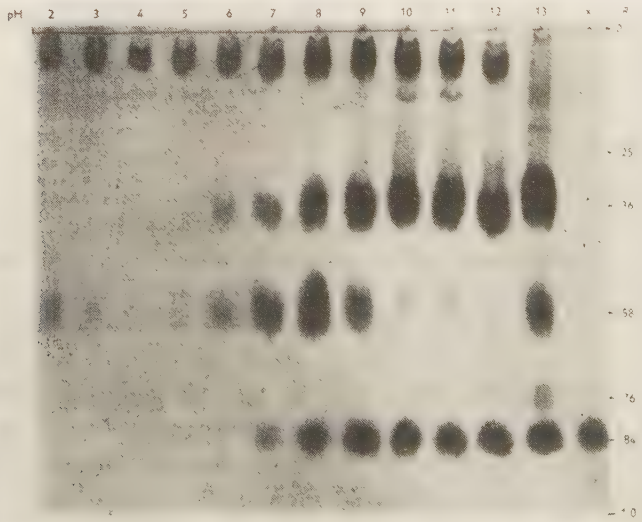


Fig. 4. Chromatogram of N-acetyl neuraminic acid after heating at 100 C for 1 hour in citrate-borate-phosphate-HCl buffer of pH 2 to 11, and in sodium hydroxide solution of pH 12 and 13. × denotes synthetic 2-carboxypyrrole. Solvent: BA. Spraying reagent: *p*-DAB.

Durch Erhitzen von Neuraminsäure-Lösungen bei pH 4-5 tritt auch nach mehreren Stunden keine Änderung des UV-Spektrums auf, und es werden nur sehr geringe Mengen von Abbau-Produkten gebildet. Bei diesem pH-Wert haben die Neuraminsäure-Derivate ihr Stabilitäts-Maximum.
Durch milde Alkali-Behandlung von Neuraminsäure-Lösungen (96)(173) tritt unter Retroaldolisierung Spaltung der Kette zwischen C-3 und C-4 ein (vgl. Abb. 3). Es entsteht Pyruvat und N-Acyl-hexosamin. Das freigesetzte N-Acyl-hexosamin reagiert dann nach Kuhn und Krüger (101)(102) weiter zu den drei Chromogenen der Morgan-Elson Reaktion (vgl. Abb. 9). Sie lassen sich als solche chromatographisch identifizieren. Darüber hinaus entstehen bei der Alkali-Behandlung neben den beschriebenen Produkten noch weitere drei Haupt-Chromogene (Abb. 15): R_f = 0,36, R_f = 0,58 und R_f = 0,84 (Papierchromatographie, Fließmittel: n-Butanol/ Eisessig/ Wasser (4:1:5 v/v)). Bei der schnell-laufenden Fraktion handelt es sich um α-Pyrrolcarbonsäure (55)(85)(70)(57). Die Natur der Produkte mit R_f = 0,36 bzw. R_f = 0,58 ist unbekannt. Beide Substanzen haben saure Eigenschaften (Adsorption an Anionenaustauschern) und zeigen im UV-Spektrum eine Absorption im Bereich um 260 mμ, woraus auf ein System von 2 oder 3 konjugierten Doppelbindungen geschlossen wird (10). Das langsam wandernde Produkt ist - zumindest teilweise - durch weitere Alkali-Behandlung in das schneller wandernde zu überführen. Jedoch entsteht aus keinem von beiden dabei α-Pyrrolcarbonsäure.

Durch Erhitzen von sauren Neuraminsäure-Lösungen tritt schnell Humin-Bildung auf. Es werden mehrere chromatographisch trennbare Abbau-Produkte gebildet, die ebenfalls wieder saure Eigenschaften zeigen. Die Hauptfraktion liegt bei R_f = 0,58 (Abb. 15) und zeigt im UV-Bereich eine Absorption bei 270 mμ. Aus NeuNAc-O-Ac (B-Sialinsäure) entsteht (Abb. 16) neben der genannten (Substanz R_f = 0,58 in Abb. 15 identisch mit Substanz R_f = 0,63 in Abb. 16) noch eine weitere Hauptfraktion mit R_f = 0,78.

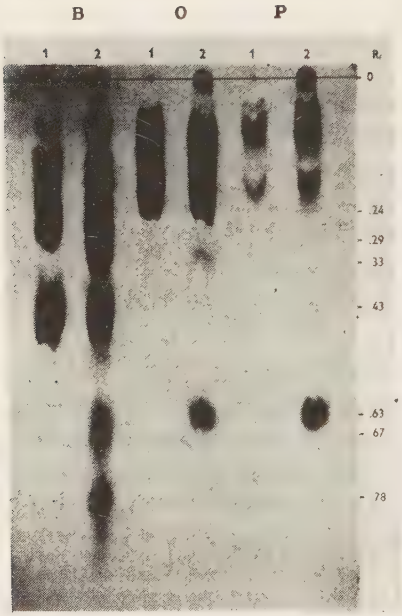


Abb. 16 Abbau verschiedener Neuraminsäure-Derivate (10)

Chromatogram of different sialic acids after heating in distilled water at 100° C for 1 hour.

B: NeuNAc-O-Ac
O: NeuNAc
P: NeuNGl

1: unheated solution
2: heated solution

Alle chromatographisch getrennten Abbau-Produkte geben mit Ehrlich Reagenz eine purpur-violette Farbe und - mit Ausnahme der Kuhn/Krüger Chromogene - eine violette Farbe mit dem Bial Reagenz.

Während die Alkali-Labilität aller Zucker ein lange bekanntes und intensiv bearbeitetes Phänomen ist (125)(15), stellt die extreme Säure-Labilität der Neuraminsäure eine Besonderheit dar, die nur den Deoxy-zuckern (Deoxy-Gruppe und Carbonyl-Gruppe in vizinaler Stellung) eigen ist. Da diese sich mit einer Geschwindigkeit von der cyclischen in die offen-kettige Form umwandeln, die um eine Zehner-Potenz größer ist als die ihrer Hydroxyl-Homologen, wird diese Transformation als der auslösende Schritt für ihren Abbau betrachtet. Weiterhin wird aus N-Acyl-neuraminsäuren - im Gegensatz zu N-Acyl-hexosaminen - mit verdünnten Mineralsäuren etwa 25% des Stickstoffs als Ammoniak freigesetzt (62)(74).

Über die Decarboxylierung liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: Blix et al. (21) stellen eine molare CO_2-Entwicklung fest, während Kean u. Roseman (78) 0,5 Mol CO_2 je Mol Neuraminsäure (12 % HCl, 100°C, 20 Min.) identifizieren. Diese Decarboxylierung kann nicht von der Struktur der Neuraminsäure als einer α-Ketosäure hergeleitet werden, da ähnliche Bedingungen (6 n HCl, 150°C, 20 Min.) zur Synthese von α-Keto-δ-amino-valeriansäure aus Dioxopiperidin (63) angewndt werden. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wird von Gottschalk der folgende, hypothetische Mechanismus vorgeschlagen(61), der den sauren Abbau der Neuraminsäure beschreibt:

Abb. 17 Degradation der NeuNAc durch Mineralsäuren (nach Gottschalk)

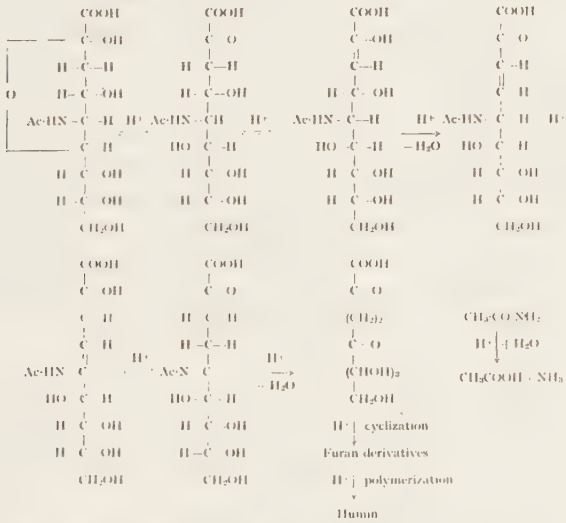


Fig. 9 Scheme of degradation of N-acetylneuraminic acid by mineral acid (Gottschalk, 1962)

Diese Hypothese ist durch experimentelle Befunde bisher nicht gestützt worden.

Den ersten geeigneten synthetischen Weg zur Aufklärung von

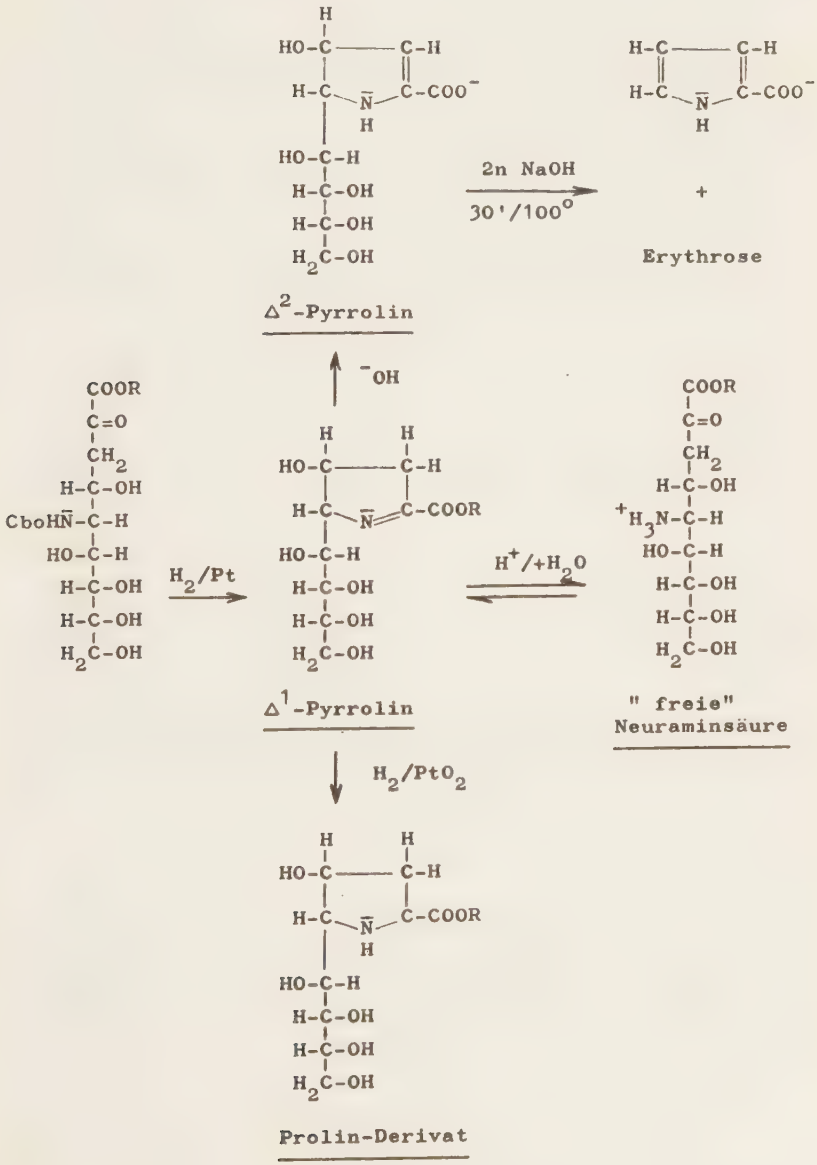
Zwischenprodukten des sauren Abbaus beschreitet Gielen (52): Um zur "freien" Neuraminsäure (C-9-Kette mit nicht acylierter Amino-Gruppe) zu gelangen, ist entweder eine Entglykosidierung der Methoxyneuraminsäure (NeuN-2-O-Me) oder eine Stickstoff-Entacylierung der NeuNAc erforderlich. Für beide Reaktionen sind saure Bedingungen anzuwenden. Auf Grund der hohen Geschwindigkeit der Folgereaktionen in diesem Milieu sind aber in gleicher Weise weder die "freie" Neuraminsäure noch die daraus sich bildenden Abbau-Produkte in definierter Form zu fassen.

Durch hydrogenolytische Entacylierung der NeuNCbo bei tiefen Temperaturen und mittlerem pH wird jedoch ein einheitliches Produkt gewonnen. Es ist als 4-Hydroxy -5-(tetrahydroxy-butyl) Δ^1-pyrrolincarbonsäure-(2) identifiziert worden (52) und stellt das Cyclisierungsprodukt der "freien" Neuraminsäure dar. Dieses Pyrrolincarbonsäure-Derivat ist jedoch äußerst unbeständig. Es dimerisiert, wie bei anderen Δ^1-Pyrrolinen in der Literatur beschrieben (l.c. 52). Der Ester hingegen zeigt diese Reaktion nicht, er läßt sich zum entsprechenden Prolin-Derivat reduzieren und gibt mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin bei pH = 2 ein Hydrazon. Daraus muß geschlossen werden, daß im Sauren zwischen der cyclischen und der offenen Form (vgl. Abb. 18) ein Gleichgewicht vorliegt, wie für die α-Keto-δ-amino-valeriansäure festgestellt worden ist (28).

Schon durch schwaches Alkali lagert sich das Δ^1-Pyrrolin in Δ^2-Pyrrolin um. Bei erhöhter Temperatur und starkem Alkali wird dann daraus α-Pyrrolcarbonsäure und Erythrose freigesetzt.

Dieser - auch im sauren Bereich - beobachtete Ringschluß zum Pyrrolin unterstützt die von Klenk und Faillard (85) auf Grund des Absorptions-Spektrums von sauer behandelter Methoxyneuraminsäure vermutete Zersetzung zu Pyrrol-ähnlichen Substanzen. Auch Karkas und Chargaff (77) kommen zu einem solchen Ergebnis. Mit Hilfe der Direkten Ehrlich Reaktion

Abb. 18 Darstellung und Reaktionen der "freien" Neuraminsäure (nach Gielen)



und der Aminoff/Warren Reaktion können folgende Charakteristika an Neuraminsäure-Derivaten festgestellt werden:

a) Eine Decarboxylierung muß infolge der unveränderten Lage des Maximums in der Perjodat/Thiobarbitursäure Reaktion ausgeschlossen werden.
b) Nach Vorbehandlung von Neuraminsäure mit 0,1 m HCl bei 100°C für 30 Min. bildet diese schon in der Kälte eine Purpur-Farbe mit dem DMAB-Reagenz.
c) Durch die gleiche Säure-Behandlung nimmt die Extinktion weder in der Direkten Ehrlich Reaktion noch in der Bial/Svennerholm Reaktion ab. Jedoch zeigt die Aminoff/Warren Reaktion einen starken Abfall.
d) Nach Perjodat-Oxidation (Kurzzeit-Reaktion) der Neuraminsäure reagiert der isolierte Aldehyd immer noch in der Svennerholm Reaktion mit Resorcin. Das Absorptions-Maximum ist von 580 nach 600 mu verschoben, der molare Extinktionskoeffizient ist annähernd verdoppelt.

Die als weitere Umlagerungsreaktion in Betracht zu ziehende Lactonisierung der Neuraminsäure ist durch den negativen Ausfall der Hydroxamat-Reaktion (3) nicht zu bestätigen. Andererseits spricht doch für die Lacton-Bildung, daß einige Säure-Abbauprodukte (50) erst wieder nach Alkali-Behandlung in dem Aminoff/Warren Test positiv reagieren. Gibbons gibt auf Grund der Analyse der recht komplexen Kinetik des Säure-Abbaus die folgende Reaktionsgleichung an:

$$B \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} NeuNAc \xrightarrow{k_3} C \xrightarrow{k_4} D$$

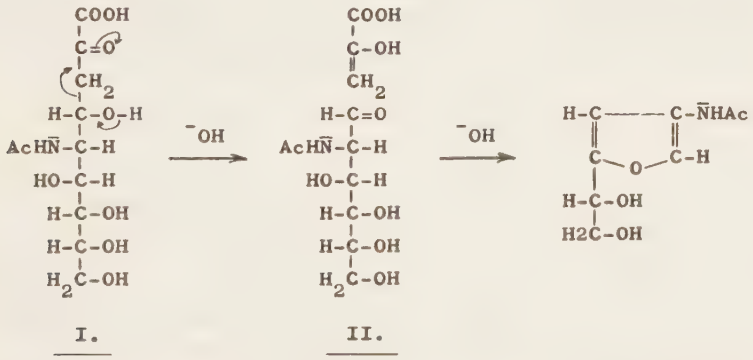
In ihr soll B das Neuraminsäure-Lacton darstellen, das durch Alkali-Behandlung - wie vorstehend beschrieben - zu Acylneuraminsäure regenerierbar ist.

2. Arbeitshypothesen

Die meisten der bisherigen Ergebnisse in der Erforschung des Neuraminsäure-Abbaus deuten stark darauf hin, daß es sich im wesentlichen um die Entstehung von Pyrrol-Körpern handelt. Es wird deshalb im folgenden versucht, mögliche Mechanismen für die Chromogen-Bildungsreaktionen aufzustellen, und die beschriebenen Phänomene an Hand der Formelbilder zu erläutern. Für den alkalischen Abbau sind folgende vier Möglichkeiten zu diskutieren:

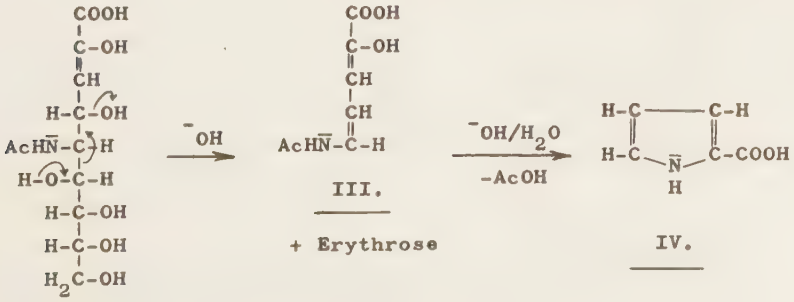
Abb. 19 Der alkalische Abbau der Neuraminsäure

a)



Reaktionsschritte: Aldolspaltung zwischen C-3 u. C-4
Cyclisierung und Dehydratisierung

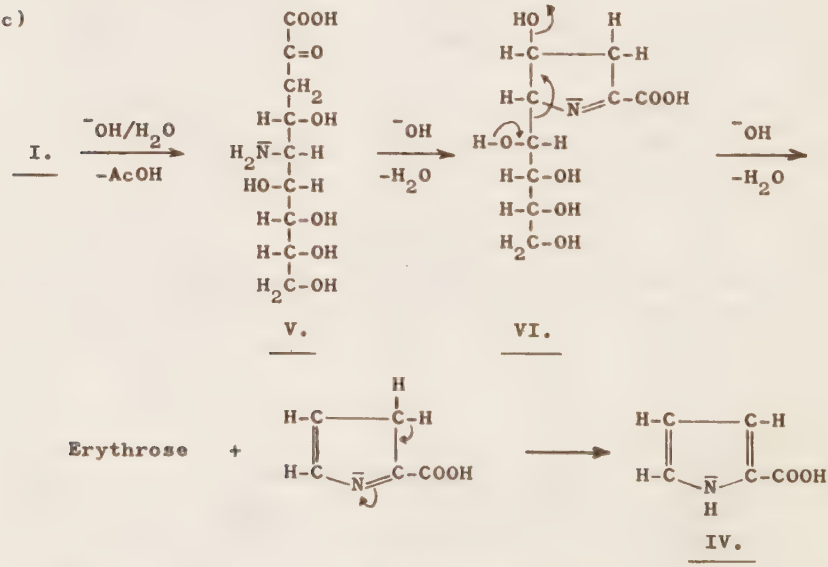
b)



Reaktionsschritte: Enolisierung von I.
Aldolspaltung zwischen C-5 u. C-6
Cyclisierung zu Pyrrol-α-carbons.

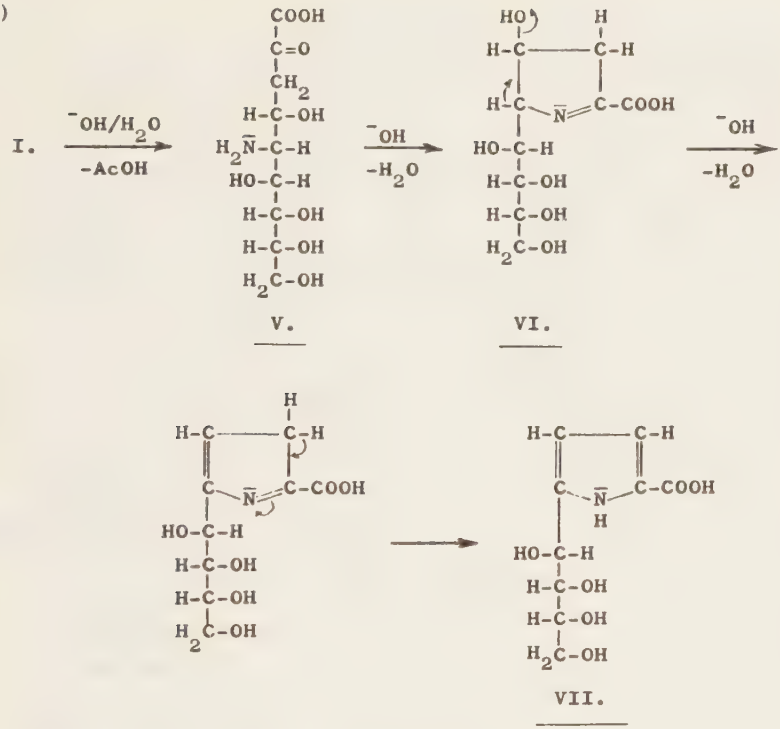
Der Reaktionsverlauf a) ist bereits bekannt und durch Experimente bestätigt. Der Reaktionsverlauf b) ist zwar nirgends diskutiert, doch sollte er in gleicher Weise möglich sein, zumal er zu den identifizierten Produkten α-Pyrrolcarbonsäure und Erythrose führt. Der Reaktionsverlauf c) ist als einziger besprochen zur Erklärung der Abbau-Produkte α-Pyrrolcarbonsäure und Erythrose. Doch ist neben diesem noch ein weiterer Weg d) zu fordern: An die Stelle der Aldolspaltung von VI. kann gleichberechtigt auch eine Dehydratisierung zum Pyrrol-Derivat VII. treten. Dies hat zur Konsequenz, daß der Tetrahydroxy-butyl-Rest durch die normale Behandlung - etwa unter Retro-aldolisierung - nicht mehr vom Pyrrol-Ring abzuspalten ist (vgl. die analoge Reaktion zum Elson-Morgan Chromogen, C.IV.1.). Hierfür spricht die bisher nie frei von Nebenprodukten erfolgende Bildung von α-Pyrrolcarbonsäure.

c)



Reaktionsschritte: N-Entacylierung
Ringschluß zum Pyrrolin
Aldolspaltung und Tautomerisierung

d)

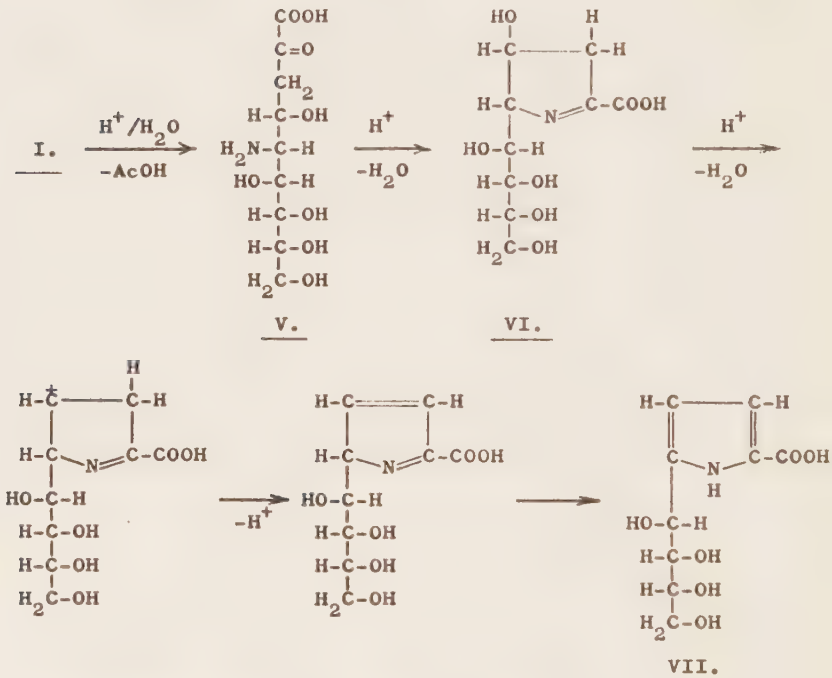


Reaktionsschritte: N-Entacylierung
Ringschluß zum Pyrrolin
Dehydratisierung und Tautomerisierung

Für den sauren Abbau der Neuraminsäure ist im wesentlichen nur der folgende (Abb. 20) Weg zu diskutieren. Nach Gielen (52) ist das Produkt VI. (Δ^1-Pyrrolin) als gesichert anzusehen (vgl. Abb. 18). Im Gegensatz zum alkalischen Abbau ist jedoch im Sauren keine Aldolspaltung möglich wie in Abb. 19 c), sondern nur eine Dehydratisierung zu VII., analog dem Weg d) des alkalischen Abbaus.

Bis auf die Umwandlung der Neuraminsäure zu den Kuhn/Krüger Chromogenen (Weg 19 a)) ist bei allen anderen Reaktionsfolgen

Abb. 20 Der saure Abbau der Neuraminsäure



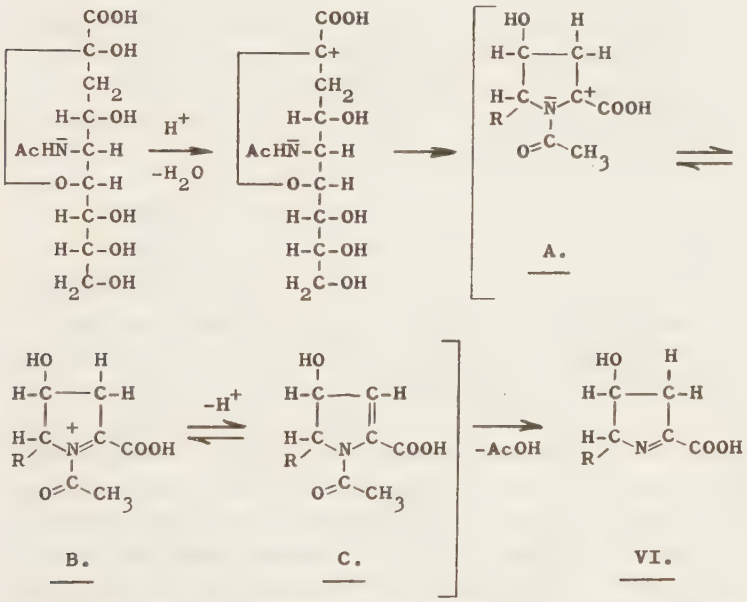
Reaktionsschritte: N-Entacylierung
Ringschluß zum Pyrrolin
Ausbildung eines Carboniumions an C-4
Stabilisierung zum Pyrrol-Derivat

vor dem Ringschluß zum Pyrrolin jeweils eine Entacylierung des Stickstoffs gefordert. Diese Reaktion ist nicht ohne weiteres verständlich, da zu ihrem Ablauf normalerweise drastischere Bedingungen (4 n HCl, 100°C, 3 h) erforderlich sind. Wie jedoch die Untersuchungen von Berggård u. Odin (10) zeigen, werden durch Temperatur-Behandlung der Neuraminsäure in allen pH-Bereichen (Abb. 15) Substanzen gebildet, die in der Direkten Ehrlich Reaktion (1 nHCl) positiv sind - ja sogar schon in der Kälte. Es müssen also bereits Pyrrol-

Körper vorliegen bzw. aus einer Zwischenstufe unter den Bedingungen der Direkten Ehrlich Reaktion leicht solche entstehen können.

Als mögliche Zwischenstufe kann ein Pyrrolidin-Derivat (Abb. 21 A) angesehen werden:

Abb. 21 Mechanismus der Entacylierung der N-Acetyl-neuraminsäure



Die hohe Geschwindigkeit der Entacylierung kann so seine Ursache haben:

a) in dem Elektronenzug zu C-2 nach der OH-Abspaltung (bei Glykosiden OR-Abspaltung) - anchimerer Effekt in A,
b) in der Veränderung der Basizität durch Ringschluß und Pyrrolin-Bildung - in B. Denn bekanntlich hängt die Spaltungsgeschwindigkeit weitgehend ab von der Natur der

Säure- wie auch der Amin-Komponente (122). Je schwächer die zugrunde liegende Base ist, desto leichter verläuft die Spaltung. Die Acyl-Reste werden in der Reihenfolge Formyl-, Acetyl-, Benzoyl-Rest zunehmend schwerer abgespalten.

c) in der Enamin-Struktur - in C. Diese vermag sich durch Protonen-Abspaltung aus A. und B. zu bilden. Sie dürfte im Hinblick auf die Acyl-Gruppe so labil sein, wie die strukturell vergleichbaren Enoläther.

Nicht unerwähnt bleiben darf aber in diesem Zusammenhang die Umacylierung als mögliche Ursache für die Labilität der Amid-Gruppierung der Neuraminsäure. N-Acyl-Derivate einer Reihe von Amino-Alkoholen zeigen intramolekulare Alkoholyse - es entstehen O-Acyl-Derivate (122):

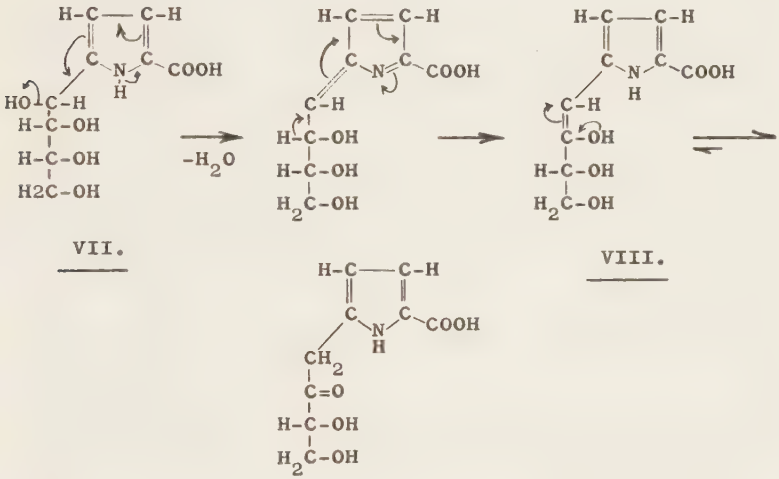
$$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NHAc \longrightarrow AcO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$$

Setzen wir nun die Entacylierung über einen der genannten Mechanismen voraus, so ist das Entstehen des bekannten Produktes α-Pyrrolcarbonsäure einerseits und des hypothetischen Produktes VII (5-Tetrahydroxybutyl-pyrrol-2-carbonsäure) andererseits verständlich. Das letztere Produkt ist jedoch sowohl unter alkalischen wie auch unter sauren Bedingungen nicht der Endpunkt der Reaktionsfolge. Das Elektronen-Sextett des Pyrrol-Ringes erleichtert die weitere Dehydratisierung- speziell in saurem Medium - entsprechend der Dehydratisierung der ß-Hydroxyaldehyde (Aldole). Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abb. 22 wiedergegeben. Mit den skizzierten Substanzen VII. und VIII. bzw. deren tautomerer Form IX. liegen Produkte vor, die im wesentlichen Erklärungen für die in der Literatur (vgl. C.V.1.) beschriebenen Beobachtungen gestatten.

a) Chromatographisches Verhalten:

Beim Vergleich mit den in Abb. 15 aufgetrennten Abbau-

Abb. 22 Dehydratisierung der 5-Tetrahydroxybutyl-pyrrol-2-carbonsäure



Produkten ist der Substanz R_f = 0,36 die Struktur VII., der Substanz R_f = 0,58 die Struktur IX. zuzuschreiben. Das entspricht einmal der zu erwartenden Wanderungsgeschwindigkeit (Verteilungschromatographie zwischen lipophiler und hydrophiler Phase), dann auch der beschriebenen beschränkten Umwandelbarkeit (ausschließlich VII.- IX.) und schließlich auch der unterschiedlichen Chromogen-Bildung über den untersuchten pH-Bereich.

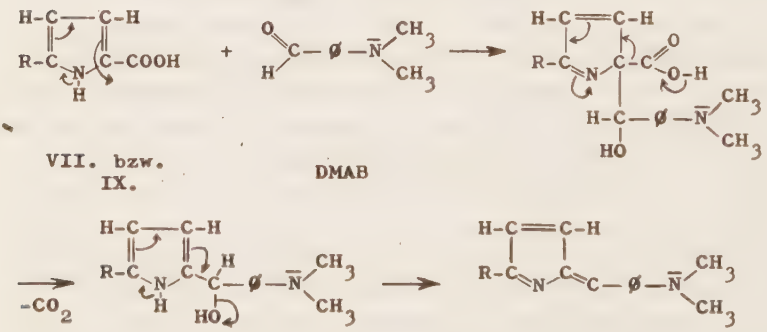
b) Spektrales Verhalten:
Die Substanz R_f = 0,36 hat ein Absorptions-Maximum bei 260 mμ, entsprechend der α-Pyrrolcarbonsäure. Die Substanz R_f = 0,58 hat ein Absorptions-Maximum bei 270 mμ. Das chromophore System ist offensichtlich um eine Doppelbindung erweitert (vgl. Abb. 22, IX,).

c) Jede Reaktion, die das Ring-Stickstoffatom des Pyrrols dazu veranlaßt, sein einsames Elektronenpaar aus dem

Elektronen-Sextett abzugeben, muß das Produkt seines aromatischen Charakters berauben. Dies ist in Mineralsäuren der Fall, so daß entsprechend dem Cyclopentadien Polymerisation eintritt. Wenn aber keine freien α- und ß-Stellungen nebeneinander vorhanden sind (wie bei IX.), so widerstehen die Pyrrole im allgemeinen der Säure-Behandlung. Jedoch stellt die Carboxyl-Gruppe in IX. einen Sonderfall dar, denn unter Verlust nur einer Carboxyl-Gruppe (1) können aus zwei Molekeln IX. dimere Produkte entstehen - entsprechend der Δ^1-Pyrrolin-carbonsäure (145). Dies steht mit den gefundenen (78) CO_2-Werten (50%) in Einklang.

d) Die Humin-Bildung kann weiterhin mit der Reaktivität des Substituenten an C-5 der Pyrrolcarbonsäure (2-Keto-3,4-dihydroxy-butyl) in Verbindung gebracht werden. Eine NH_3-Stickstoff-Entwicklung ist durch eine - zumindest teilweise - Ringaufspaltung unter den Bestimmungs-Bedingungen (113)(2 n HCl, 100°C, 3 h) zu erklären.

Abb. 23 Entstehung des Chromophors der Direkten Ehrlich Reaktion



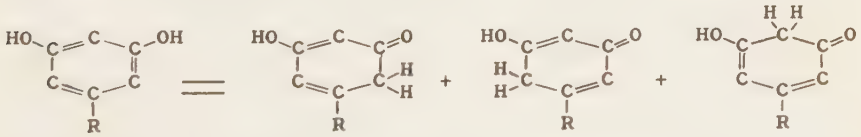
R = Tetrahydroxy-butyl oder 2-Keto-3,4-di-hydroxy-butyl

Ø = Benzol-Kern

Die geforderten Degradationsprodukte oder Chromogene stellen voraussichtlich die Neuraminsäure-Komponenten der chromophoren Gruppen der Bestimmungs-Methoden dar. Während in der Ehrlich Reaktion der Pyrrolkern in der bekannten Weise (vgl. Abb. 7) - wahrscheinlich unter gleichzeitiger Decarboxylierung infolge der Aldolkondensation - mit dem DMAB reagiert (Abb. 23, vorstehend), handelt es sich in der Bial/Svennerholm Reaktion und vermutlich auch in der Dische Reaktion um den Angriff auf eine Carbonyl-Funktion. Dieser Tatsache ist zwar Rechnung getragen worden, jedoch ist bislang nur die C-2-Carbonyl-Gruppe als Reaktionszentrum angesprochen (59) (151). Das Produkt IX. stellt aber mit der C-7-Carbonyl-Gruppe eine andere Funktion für einen nukleophilen Angriff zur Verfügung.
Dafür, daß Hydroxy-Aromaten zu solchen Reaktionen befähigt sind, spricht einmal das Beispiel der Reimer-Tiemann Synthese - alkalisches Milieu - und zum anderen die Kondensation von Benzaldehyd und weiteren aromatischen und ungesättigten Aldehyden mit Resorcin, Orcin, Phloroglucin etc. - im sauren Milieu (120)(144)(137)(91).

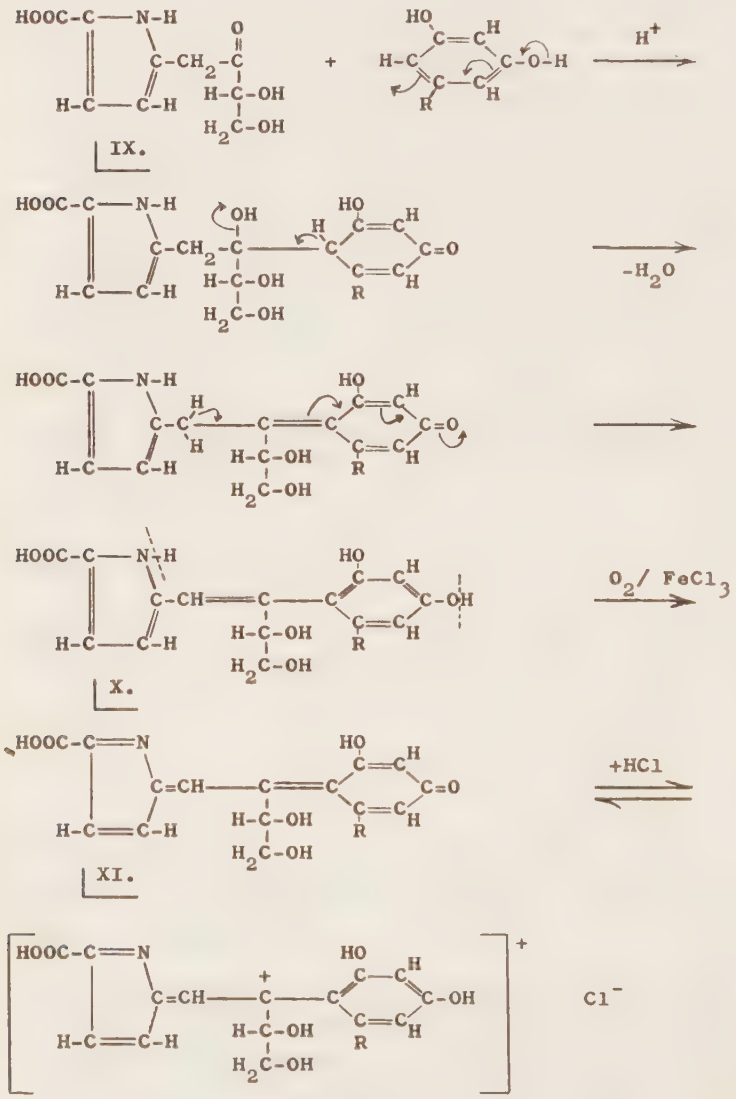
Die Grundlage für diese Eigenschaft der Poly-hydroxy-aromaten besteht in deren Möglichkeit, tautomere Formen auszubilden (154).

Abb. 24 Tautomerie der Hydroxy-Phenole



Entsprechend der von Anger und Ofri (5) für ein ganzes Spektrum von Farbstoffen angegebenen Grundstruktur muß die chromophore Gruppe der Neuraminsäure-Bestimmung nach Bial/Svennerholm folgendermaßen aus dem Chromogen IX. entstehen:

Abb. 25 Entstehung des Chromophors der Bial/Svennerholm Reaktion



Als Kondensations-Produkt aus dem postulierten Chromogen IX. und dem m-Hydroxy-phenol ist die Verbindung X. zu erwarten. Diese enthält ein großes konjugiertes System, in dem eine aromatische O-H Gruppe das eine Ende und eine aromatische N-H Gruppe das andere Ende darstellt.

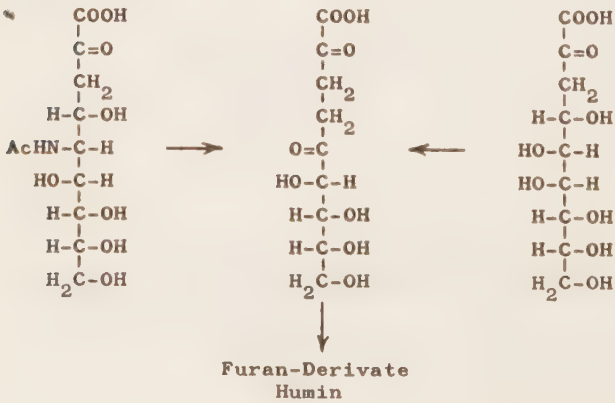
Eine solche Struktur ist der des Hydrochinons vergleichbar. Deshalb ist auch hier eine Autoxidation zu fordern. Diese kann offensichtlich durch geeignete Liganden wie Fe^{+++} oder Cu^{++} bedeutend beschleunigt werden. Als eigentliches Chromophor ist somit nicht das Kondensations-Produkt X., sondern dessen oxidierte, chinoide Form XI. anzusehen. Mit XII. ist eine der möglichen mesomeren Strukturen des Farbstoffs gekennzeichnet.

3. Abgrenzung der Arbeit

Die zur Bestätigung dieser Hypothesen durchzuführenden Experimente bergen jedoch zwei große Schwierigkeiten in sich:
a) Es kann wegen der schweren Zugänglichkeit der Materialien nicht in beliebiger Menge Substanz eingesetzt werden.
b) Die Chromogene sowohl als auch das Chromophor erweisen sich als äußerst instabil.
Nur durch gezielte Synthesen und Vergleichs-Chromophore lassen sich vorerst Rückschlüsse ziehen. Unterwirft man eine Reihe homologer und analoger Substanzen den gleichen, für die Neuraminsäure diskutierten Reaktionsschritten, so ergibt sich folgendes Bild:

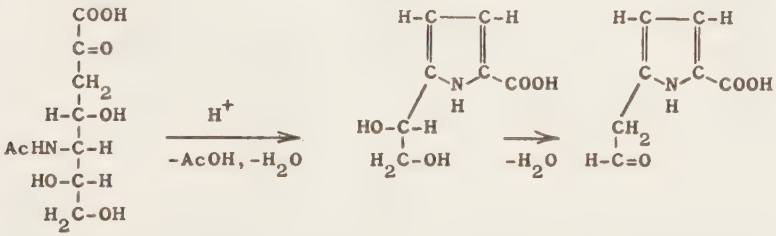
a) Zur Ausbildung des Pyrrol-Ringes ist der Stickstoff an C-5 der Neuraminsäure essentiell. Gottschalks Abbau-Schema (Abb. 17) kann nicht zutreffend sein, wenn die 3-Deoxy-nonulosonsäure (C_9OH), die 3-Deoxy-hexulosonsäure (C_6OH) und die 3-Deoxy-pentulosonsäure (C_5OH) keine Bial/Svennerholm Reaktion ergeben (vgl. Abb. 26).

Abb. 26 Abbau von NeuNAc und 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren (nach Gottschalk)



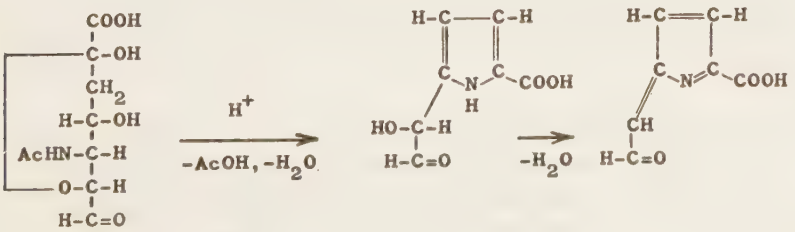
b) Eine 3,5-Dideoxy-5-acetamido-heptulosonsäure darf sich nur geringfügig in der Lage des Maximums und etwas stärker im molaren Extinktions-Koeffizienten von den Acylneuraminsäuren unterscheiden. Denn durch Cyclisierung und Dehydratisierung (vgl. Abb. 27) entsteht an C-7 eine Aldehyd-Funktion anstelle der im Neuraminsäure-Abbauprodukt vergleichbaren Keto-Funktion (siehe Abb. 22).

Abb. 27 Chromogen-Bildung der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure



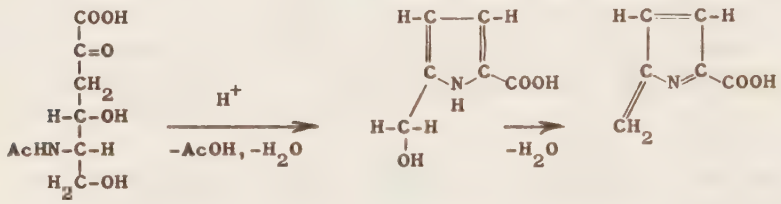
c) Nach Perjodat-Oxidation der NeuNAc muß der entstehende Aldehyd in der Bial/Reaktion die gleiche Verschiebung des Absorptions-Maximums wie unter b), aber einen höheren Extinktions-Koeffizienten als dort, aufweisen. Es entsteht nämlich die der Struktur XI. (Abb. 25) zugrunde liegende, oxidierte Form der Pyrrol-Komponente (vgl. Abb. 28).

Abb. 28 Chromogen-Bildung des HIO_4-Oxidationsproduktes der NeuNAc



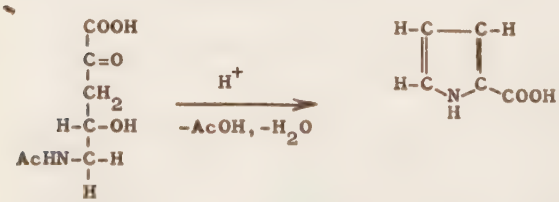
d) Eine 3,5-Dideoxy-5-acetamido-hexulosonsäure ist hinsichtlich des Chromogens völlig von den bisherigen Substanzen zu unterscheiden, da sie keine Carbonyl-Funktion tragen kann.(vgl. Abb. 29). Es entsteht folglich auch kein Methin-Farbstoff wie bei den Acylneuraminsäuren und den vorstehend unter b) und c) angegebenen Säuren.

Abb. 29 Chromogen-Bildung der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure



e) Eine 3,5-Dideoxy-5-acetamido-pentulosonsäure kann sich in der Bial-Bestimmung nur wie α-Pyrrolcarbonsäure bzw. wie Pyrrol verhalten: Die Spektren müssen praktisch identisch sein und sind Ausdruck der bereits polymerisierten Pyrrole (vgl. Abb. 30).

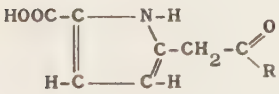
Abb. 30 Chromogen-Bildung der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure



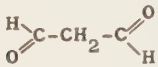
f) Aldehyde, wie Propandialdehyd und Glutacondialdehyd, zeigen eine Struktur entsprechend der Atom-Gruppe C-5 bis C-7 bzw. C-3 bis C-7 in dem postulierten Chromogen IX (vgl. Abb. 31). Durch Reaktion dieser Verbindungen mit den

Hydroxy-Aromaten müssen vergleichbare Chromophore entstehen, da im wesentlichen die ß,γ-ungesättigte Carbonyl-Gruppe die Chromogen-Eigenschaft ausmacht.

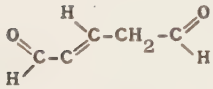
Abb. 31 Struktur-Vergleich: Chromogen - Aldehyde



IX.



Propandialdehyd



Glutacondialdehyd

Alle getroffenen Voraussagen a) bis f) werden in Experimenten bestätigt. Sie sind also geeignet, die aufgestellten neuen Hypothesen sowohl hinsichtlich des Säure-Abbaus der Neuraminsäure wie auch der Bildung des Bial/Svennerholm-Chromophors zu stützen.

Danach entsteht aus Acylneuraminsäuren unter Cyclisierung mit gleichzeitiger Stickstoff-Entacylierung als primäres Produkt 2-Carboxy-5-(tetrahydroxy-butyl)-pyrrol. Dieses wird leicht unter Dehydratisierung in 2-Carboxy-5-(2-keto-3,4-dihydroxy-butyl)-pyrrol umgewandelt (vgl. Abb. 22). Bei Anwesenheit von geeigneten Kopplungs-Komponenten (hier Orcin bzw. Resorcin) bildet sich daraus der Methin-Farbstoff des Chromophors.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

D. I. Synthese-Methoden

1. 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren

Säuren dieser Struktur sind in der Natur weit verbreitet (53). Ihre Biosynthese entspricht teilweise der der Neuraminsäure aus Aldose bzw. Acetamidoaldose und Pyruvat:

Ketodeoxy-octonsäure	KDO	(109)(48)
Ketodeoxy-heptonsäure	KDH	(71)(148)
Ketodeoxy-gluconsäure	KDG_{Glc}	(72).

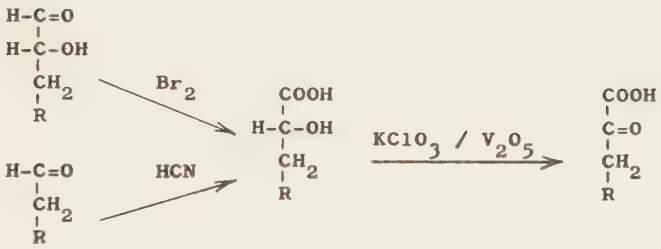
Teilweise entstehen sie aber als Oxidations-Produkte aus den entsprechenden Aldonsäuren bezw. Aminoaldonsäuren:

Ketodeoxy-gluconsäure	KDG_{Glc}	(112)(92)(119)(146)
Ketodeoxy-galaktonsäure	KDG_{Gal}	(39)
D-Ketodeoxy-arabonsäure	D-KDA	(132)
L-Ketodeoxy-arabonsäure	L-KDA	(164).

Die chemische Synthese folgt beiden Wegen: Sie entspricht entweder den beiden für Neuraminsäure üblichen Verfahren nach Cornforth et al. (36) bzw. nach Kuhn und Baschang(94) oder der von DeLey u. Doudoroff (39) angewandten Oxidation der 3-Deoxy-aldonsäuren mit $KClO_3/V_2O_5$. Kuhn et al. haben ein weiteres allgemeines Verfahren entwickelt. Die genannten Methoden seien kurz skizziert und die entsprechenden Anwendungen zitiert.

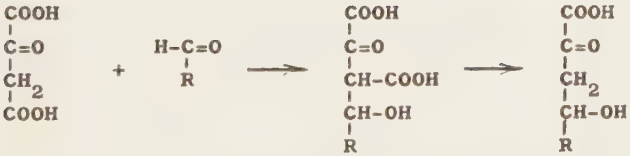
Abb. 32 Synthese-Wege der 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren

a) DeLey und Doudoroff



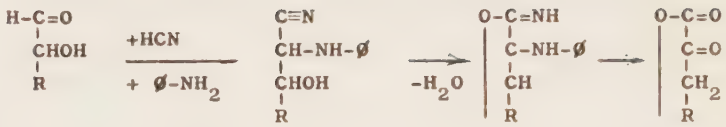
KDG_{Glc} u. KDG_{Gal}		DeLey u. Doudoroff (39)
KDG_{Glc}		Smiley u. Ashwell (146)
KDH		Sprinson et al. (147)
KDH		Weissbach u. Hurwitz (165)

b) Cornforth et al.



DL - KDA	Stoolmiller et al. (15o)(134)(149)
KDH	Portsmouth (133)
KDO	Ghalambar et al. (48)
KDO	Hershberg et al. (67)

c) Kuhn et al.



KDG_{Glc} u. KDG_{Gal}	Kuhn et al. (1o5)
D-KDG_{Glc} u. L-KDG_{GLc}	Paerels (129)
KDH	Paerels u. Geluk (130)

d) Kuhn u. Baschang

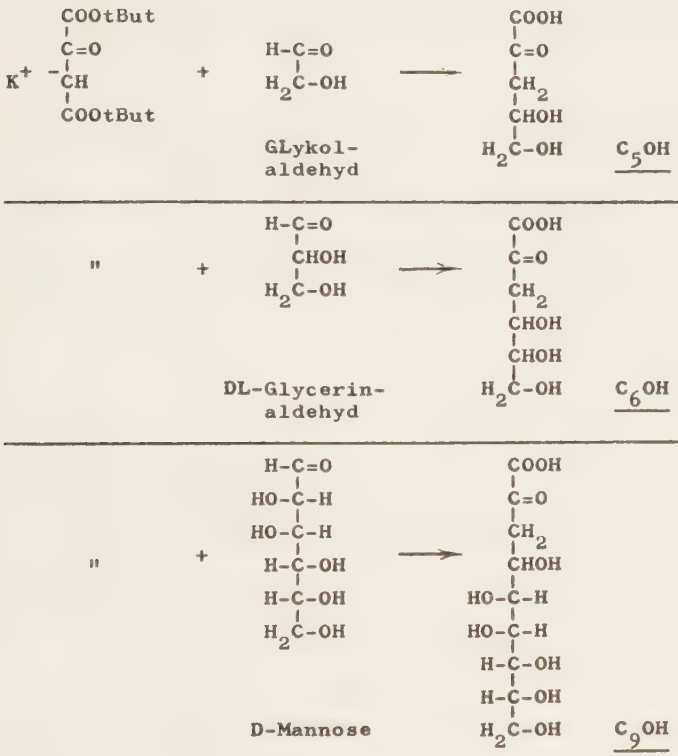
NeuNAc	Kuhn u. Baschang (94)
KDO	Hershberg u. Binkley (66)

Die von der Neuraminsäure-Synthese her bekannte Methode d) liefert mit den entsprechenden Aldehyd-Zuckern die folgenden Produkte:

2-Keto-3-deoxy-pentonsäure	(C_5OH)
2-Keto-3-deoxy-hexonsäure	(C_6OH)
2-Keto-3-deoxy-nononsäure	(C_9OH

Von diesen ist vor kurzem (53) die 3-Deoxy-nonulosonsäure (2-Keto-3-deoxy-nononsäure) auf gleichem Wege dargestellt worden.

Abb. 33 Synthese von 2-Keto-3-deoxy- pentosäure (C_5OH)
- hexonsäure (C_6OH)
- nononsäure (C_9OH)

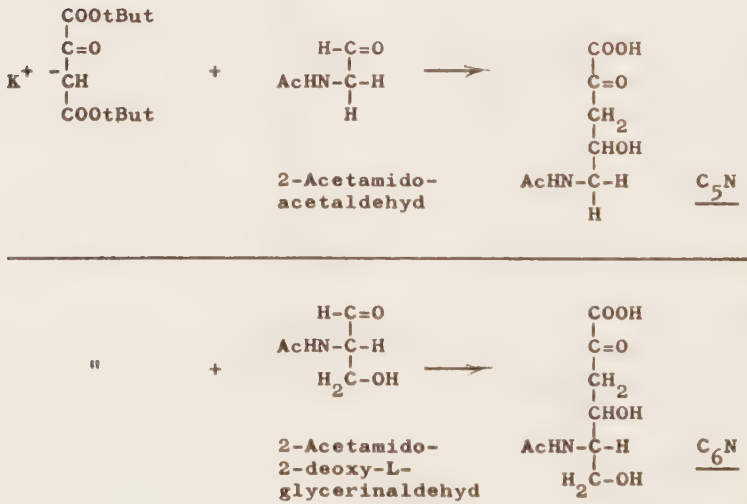


2. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldonsäuren

In dieser Reihe sind bisher nur die Neuraminsäure und die "Neuraminsäure minus 2 CHOH" (C_7N-2-O-Me) (168) bekannt. Die gleiche Synthese-Methode wie im voranstehenden Abschnitt liefert:

2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure (C_5N)
2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure (C_6N).

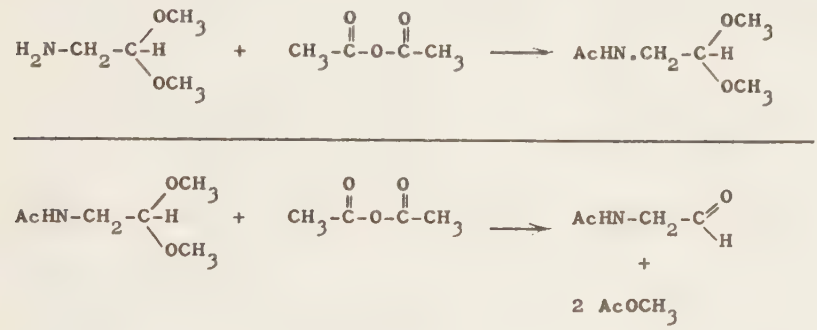
Abb. 34 Synthese von 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido - pentonsäure (C_5N) - hexonsäure (C_6N)



Während in der Reihe der Aldose-Kondensationskomponenten die kurzen Glieder - Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd - bekannt sind, gibt es bislang keine Synthese für die entsprechenden 2-Acetamido-Verbindungen.

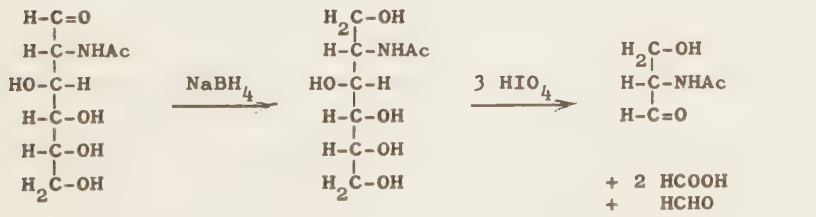
a) Die Synthese des Acetamido-acetaldehyds ist nach folgendem Reaktionsschema durchführbar:

Abb. 35 Synthese von 2-Acetamido-acetaldehyd



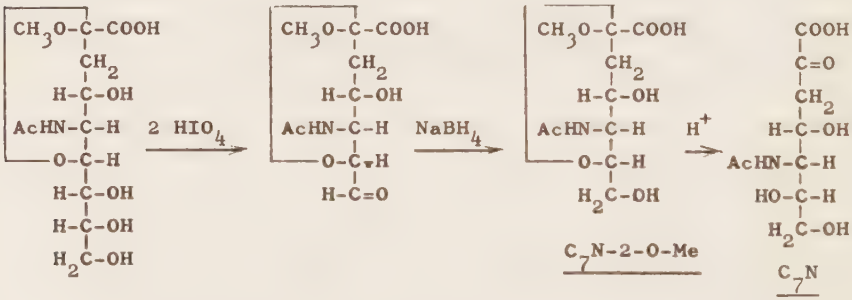
b) Der einfachste Amino-Zucker, 2-Amino-2-deoxy-glycerinaldehyd, ist nach David und Veyrières (40) nur unterhalb pH 3 in Lösung stabil, sodaß eine N-Acylierung nicht zu erzielen ist.
Ausgehend von N-Acetyl-glucosamin ergibt sich jedoch ein einfacher Weg direkt zu dem gesuchten 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyd:

Abb. 36 Synthese von 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyd



Die 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure (C_7N) ("Neuraminsäure minus 2 CHOH") kann leicht aus N-Acetyl-neuraminsäure-ß-methylglykosid (170) nach der von Kuhn und Gauhe (100) angegebenen Methode gewonnen werden. Da sie selbst recht instabil ist, wird ihr Glykosid - weiterhin als C_7N-2-O-Me bezeichnet - für die Analytik verwandt.

Abb. 37 Synthese von 2-Keto-3,5-diedeoxy-5-acetamido-heptonsäure

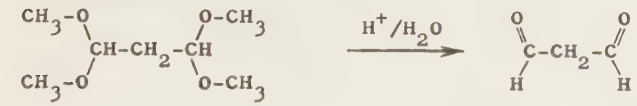


3. Aldehyde und α-Pyrrolcarbonsäure

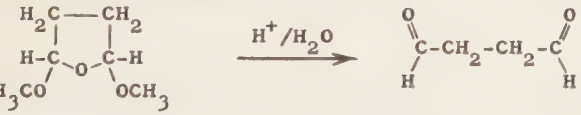
Nach den üblichen Verfahren werden aus zugänglichen Vorstufen die Produkte wie folgt dargestellt:

Abb. 38 Darstellung von Aldehyden und α-Pyrrolcarboncäure

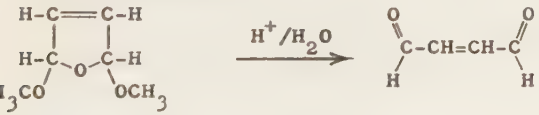
Malondialdehyd (Propandialdehyd):



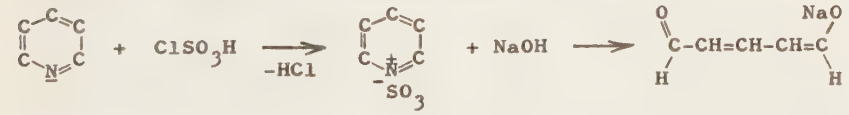
Succindialdehyd:



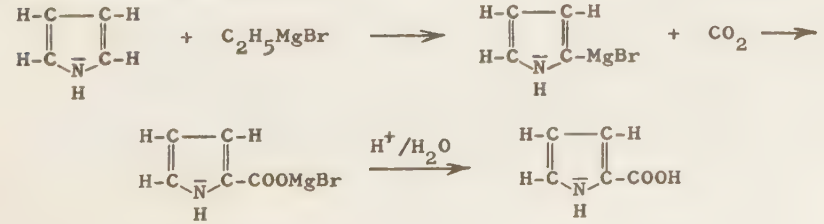
Maleindialdehyd:



Glutacondialdehyd: (nach Baumgarten (9))



α-Pyrrolcarbonsäure: (nach McCay u. Schmidt (115))



D. II. Arbeitsvorschriften

1. Kalium-oxalessigsäure-di-tert.-butylester (K-Salz)

In 440 ml tert.-Butanol (6 Mol) wird 19,6 g Kalium (0,5 MOl) gelöst. Nach Hinzufügen von 111 g Oxalsäure-di-tert.-butylester (0,55 Mol) (6) wird das Gemisch mit 58,1 g tert.-Butylacetat (0,5 Mol) versetzt und über 3 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen gibt man ca. 1 l Petroläther (über Na getrocknet) hinzu, rührt den breiigen, gelben Niederschlag gut durch und saugt ihn auf einer Nutsche ab. Der Niederschlag wird mit Petroläther farblos gewaschen und im Vakuum bei 5o°C getrocknet.
Ausbeute: 126 g; das sind 90 % d.Th.

Die Synthese des Kalium-oxalessigsäure-di-tert.-butylesters wird durch das Auswaschen des Produktes mit Petroläther im Aufarbeitungsschritt wesentlich verbessert. Es entfällt das Arbeiten mit der Heißwasser-Nutsche, und das Salz kann in größerer Reinheit gewonnen werden. Die Ausbeute wird gegenüber der bisherigen Methode (64) nicht beeinträchtigt.

2. N-Acetyl-amino-acetaldehyd

In 150 ml Äther (getrocknet über Na) wird 21 g Amino-acetaldehyd-dimethylacetal (0,2 Mol) gelöst und langsam unter Rühren mit 25,5 g Essigsäure-anhydrid (0,25 Mol) versetzt. Dabei erwärmt sich das Gemisch und siedet kurze Zeit unter Rückfluß. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationverdampfer abgezogen.
Ausbeute Rohprodukt: 30,7 g
Das Rohprodukt N-Acetyl-amino-acetaldehyd-dimethylacetal wird im Hochvakuum fraktioniert.
Ausbeute: 25 g; das sind 85 % d.Th.

Kp.: 83°C / 0,06 mm Hg
n_D^{20}: 1,4450

Abb. 39 IR-Spektrum von Amino-acetaldehyd-dimethylacetal
Film 0,025 mm

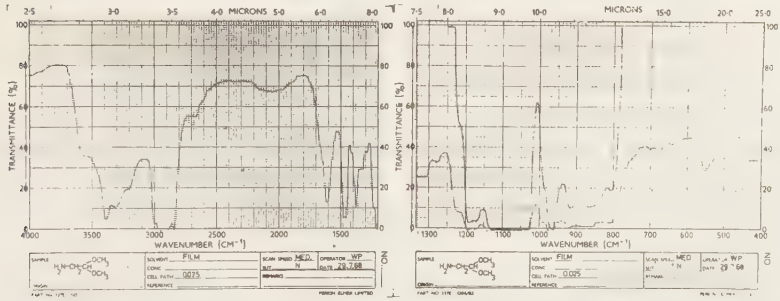
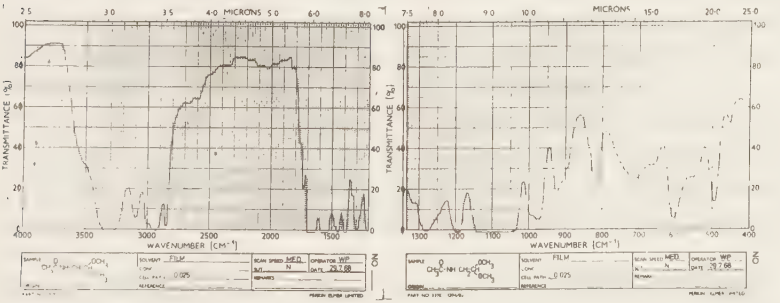


Abb. 40 IR-Spektrum von N-Acetyl-amino-acetaldehyd-dimethylacetal, Film 0,025 mm



Die Synthese des N-Acetyl-amino-acetaldehyds wird vor allem IR-spektroskopisch verfolgt:

Das Amino-acetaldehyd-dimethylacetal als Ausgangssubstanz (Abb. 39) zeigt die typischen NH_2-Absorptionen:

3300-3400 cm^{-1} NH_2-Valenz

1610 cm^{-1} NH_2-Deformation

und eine sehr starke breite Absoption (normalerweise Dublett) der Acetal-Gruppierung: 1030-1130 cm^{-1}.

Das Zwischenprodukt N-Acetyl-amino-acetaldehyd-dimethylacetal (Abb. 40) zeigt neben der gleichen Acetal-Absorption die für sekundäre Amide charakteristischen Schwingungsabsorptionen:

3270-3320 cm^{-1}		NH-Valenz
3090 cm^{-1}		NH-Valenz
1630-1880 cm^{-1}		C=O Valenz
1520-1580 cm^{-1}		NH-Deformation.
605 cm^{-1}		NH-Deformation.

20,0 g (0,15 Mol) des erhaltenen acylierten Aminoacetals werden zur Acetalspaltung mit 16,3 g (0,16 Mol) Essigsäureanhydrid und einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure oder einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure versetzt. Das Gemisch wird langsam mit Hilfe eines Ölbads auf 155-160°C gebracht. Dabei beginnt es zu sieden, und Essigsäure-methylester destilliert zwischen 65° und 90°C ab. Nach beendeter Reaktion wird der entstandene Aldehyd im Hochvakuum fraktioniert. Der N-Acetyl-amino-acetaldehyd ist sehr unbeständig und färbt sich rasch dunkel-rot. Bei -10°C ist er jedoch längere Zeit haltbar.

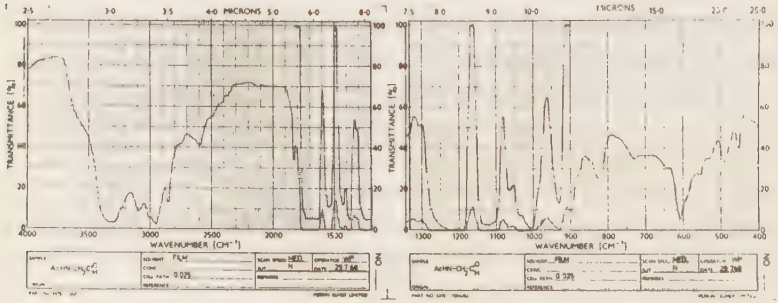
Ausbeute : 9,1 g oder 60 % d.Th.

Kp.: 65° / 0,07 mm Hg

n_D^{20}: 1,4547

Dünnschichtchromatogramm: Abb. 43,4

Abb. 41 IR-Spektrum des N-Acetyl-amino-acetaldehyds
Film 0,025 mm



Der N-Acetyl-amino-acetaldehyd weist die oben angegebenen Absorptionen der sekundären Amide und zusätzlich die eines aliphatischen Aldehyds auf:

1720 cm^{-1}	C=O Valenz
1180-1230 cm^{-1}	C-H Deformation.

3. 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyd

11,05 g (50 mMol) N-Acetyl-glucosamin werden in 150 ml Wasser gelöst und unter Eis-Kühlung und Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 0,53 g $NaBH_4$ (14 mMol) in 50 ml Wasser versetzt. Nach beendeter Zugabe wird die Mischung noch 60 Min. weitergerührt. Dann säuert man mit 1 n H_2SO_4 schwach an, entgast und filtriert zur Entfernung der Kationen durch eine Säule (30X2,4 cm) gefüllt mit Dowex-50 (H^+-Form); mit 500 ml Wasser wird nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden schonend auf etwa 200 ml eingeengt und zur Entfernung der Anionen über eine Säule (30 X 2,4 cm), gefüllt mit Lewatit MIH (CO_3^{--}-Form), gegeben.

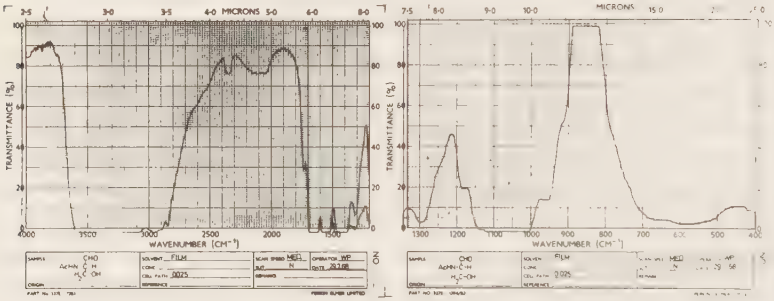
Das Eluat enthält 2-Acetamido-2-deoxy-glucitol, welches sogleich weiterverarbeitet wird: Nach dem Einengen auf 250 ml wird die Lösung bei 0-3°C im Dunklen mit 35,3 g (165 mMol) $NaIO_4$ in 250 ml Wasser versetzt. Nach 5 Stunden wird das Gemisch in der Kälte (0-3° C) deionisiert: Kationenaustauscher Dowex-50 (H^+-Form), Säule 50 X 2,4 cm; Anionenaustauscher Lewatit MIH (CO_3^{--}-Form), Säule 50 X 2,4 cm. Die gesammelten Eluate werden am Rotationsverdampfer zum Syrup eingeengt und dieser durch mehrmaliges Abdampfen mit Äthanol getrocknet. Kristallisationsversuche sind erfolglos geblieben.

Ausbeute: 5,4 g oder 82 % d.Th.

Das IR-Spektrum des 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyds ist nur schwer zu deuten, da der erhaltene Syrup offensichtlich nicht rein genug vorliegt und durch Assoziation

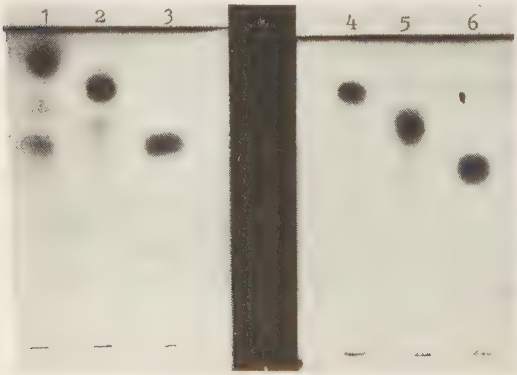
Bandenverbreiterung auftritt. Für die weitere Synthese kann er jedoch als einheitliches Produkt (vgl. Dünnschichtchromatogramm Abb. 43,5) eingesetzt werden. Destillative Fraktionierung führt vielleicht zu größerer Reinheit.

Abb. 42 IR-Spektrum des 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyds, Film ca. 0,025 mm



Die zur Kondensation zu den Deoxysäuren eingesetzten Aldehyde sind im Dünnschichtchromatogramm Abb. 43 zusammengefasst. Mit steigender Molekülgröße nehmen die R_f-Werte ab, sowohl in der Reihe der Hydroxy - wie auch in der Reihe der Acetamido-Verbindungen. Von den handelsüblichen Produkten Glykolaldehyd, D,L-Glycerinaldehyd und Mannose sind die ersten beiden stark verunreinigt.

Abb. 43 Dünnschichtchromatogramm der Aldehyd-Kopplungskomponenten



Chromatographie-System I.

1: Glykolaldehyd

2: DL-Glycerinaldehyd

3: D-Mannose

4: N-Acetyl-aminoacetaldehyd

5: 2-Acetamido-2-deoxy-L-Glycerinaldehyd

6: N-Acetyl-glucosamin

4. 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure (C_5OH)

4,25 g (15 mMol) Kalium-di-tert.-butyl-oxalacetat (vgl. D.II.1) werden in 50 ml wasserfreiem Methanol suspendiert und dann sofort 0,60 g (10 mMol) Glykolaldehyd hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wird mit Stickstoff durchgespült, gut verschlossen und 5 Tage lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird das Gemisch mit Dowex-50 (H^+-Form) - das Harz wird zuvor mit wasserfreiem Methanol gewaschen - solange versetzt, bis der p_H der orangen Suspension von etwa 11 auf etwa p_H 4 gefallen ist. Während dieser Behandlung löst sich der ungelöste Anteil der Suspension auf, und die Lösung wird hellgelb. Das Harz wird abfiltriert und mit wasserfreiem Methanol ausgewaschen. Die methanolische Lösung wird dann über eine kleine Dowex-50 - Säule (15 X 1 cm) von Kationen befreit und die Eluate am Rotationsverdampfer zum Syrup eingeengt. Der Syrup wird mehrfach mit Äther digeriert, bis keine weiteren Chromogene mehr entfernt werden. Zurück bleibt ein fast farbloser Syrup (1,65 g, 7,2 mMol), welcher 3-Deoxy-3-tert.-butyloxycarbonyl-2-en-2-ol-DL-pentonsäure-γ-lacton darstellt.

Dieser wird in 70 ml dest. Wasser suspendiert und die Mischung auf einem Dampfbad zum Sieden erhitzt. Nach etwa 15 Min. hört die Gasentwicklung (CO_2 und Isobutylen) auf, und die abgekühlte Lösung wird dann mehrmals mit Äther extrahiert. Die gelbe wässrige Phase wird durch Aktivkohle (2,5 g) filtriert, am Rotationsverdampfer zum Syrup eingeengt und mit Äthanol getrocknet. Das verbleibende hygroskopische Pulver (0,7 g; 5,4 mMol) stellt 3-Deoxy-2-en-2-ol-pentonsäure-γ-lacton dar.

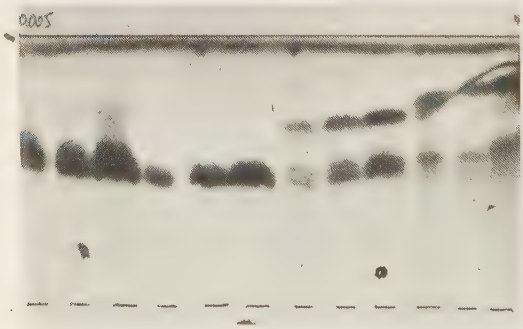
Zur Aufspaltung des Lacton-Ringes löst man das Pulver in 50 ml Eiswasser, stellt den p_H der Lösung mit 0,1 n Ammoniumhydroxid auf 9 ein und beläßt sie 36 Stunden bei 0-4°C. Der p_H-Wert muß von Zeit zu Zeit nachgestellt werden. Die erhaltene gelbe Lösung wird sodann über eine kleine Säule (15 X 1 cm) Dowex-50 (H^+-Form) gegeben, über 2,5 g Aktivkohle filtriert und

auf 50 ml eingeengt. Diese Lösung wird auf eine Anionenaustauscher-Säule (50 X 1,8 cm), Dowex-1X8 ($HCOO^-$-Form) aufgetragen und die Säule mit 300 ml Wasser gewaschen. Die adsorbierte 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure eluiert man dann durch Anlegen eines linearen Ameisensäure-Gradienten (Vorratsgefäß 1 l 1 n HCOOH, Mischgefäß 1 l Wasser). Ein einzelner Thiobarbitursäure-positiver Peak wird gewonnen, der gesammelt mehrmals mit Wasser am Rotationsverdampfer eingeengt und schließlich gefriergetrocknet wird. Zurück bleibt ein sehr hygroskopisches, leicht gelbliches Pulver.

Ausbeute: 237 mg (1,6 mMol) 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure; bezogen auf eingesetzten Glykolaldehyd: 16 % d.Th.

Das Rohprodukt erweist sich dünnschichtchromatographisch (vgl. Abb. 44, C_5OH), ebenso wie das Rohprodukt der C_5N, als nicht einheitlich, während C_6OH und C_6N keiner weiteren Reinigung bedürfen.

Abb. 44 Dünnschichtchromatogramm der synthetischen Aldonsäuren (Rohprodukte); Veranschaulichung der unterschiedlichen Stabilität.



Chromatographie-System II.

H_2SO_4-Färbung

C_6OH : 2-Keto-3-deoxy-hexonsäure; C_5OH : 2-Keto-3-deoxy-pentons.
C_6N : 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure;
C_5N : 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure.

Über die Stabilität ist also zu bemerken, daß vor allem die Pentonsäuren leicht zu Chromogenen führen: α-Furancarbonsäure und α-Pyrrolcarbonsäure. Das hat sicherlich seinen Grund in der Tatsache, daß beide Moleküle nicht eine stabilisierende Pyranosestruktur annehmen können. Über die geringe Stabilität der 2-Keto-3-deoxy-D-arabonsäure ist bereits berichtet worden (132).

Die schneller wandernde Substanz oberhalb C_5OH (Abb. 44) ist entsprechend ihrem R_f-Wert als α-Furancarbonsäure anzusprechen. Sie kann von der 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure auf Grund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit bei der Gel-Chromatographie (aromatischer Charakter der α-Furancarbonsäure!) abgetrennt werden.

68 mg der gefriergetrockneten uneinheitlichen 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure werden auf einer Sephadex G-10 Säule (80 X 1 cm) fraktioniert. Die eluierten Fraktionen werden dünnschicht-chromatographisch und mit der Aminoff-Bestimmung getestet. Dabei stimmt der nach Aminoff positive Peak mit der niedriger wandernden Fraktion überein. Er wird vor der α-Furancarbonsäure eluiert. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und gefriergetrocknet.

Ausbeute (Reinprodukt): 36,3 mg; 53,4 % bezogen auf Rohprodukt (nach Trocknen bei 50°C)

Die Reinheit der 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure und der weiteren synthetisierten Aldonsäuren wird geprüft durch:

1) Molekulargewichtsbestimmung auf titrimetrischem Wege,
2) α-Ketosäure-Bestimmung mit der empfindlichen und spezifischen Semicarbazid-Methode,
3) Dünnschichtchromatographie.

Zur zusätzlichen Charakterisierung dient die IR-Spektroskopie.

Es werden Standard-Lösungen hergestellt:

Lösung A: ca. 20 µMol/ml, jeweils für die titrimetrische Analyse und die UV-Spektroskopie (vgl. D.IV.2)

Lösung B: ca. 0,4 µMol/ml, jeweils für die Semicarbazid-Bestimmung und die UV-Spektrometrie.

Lösung A: Die Substanz C_5OH wird in 12 ml Wasser gelöst:
1 ml - 3025 γ (20,4 µMol)

Lösung B: Von Lösung A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt:
1 ml - 60,5 γ (0,408 µMol)

Titration: 1 ml Lsg. A - 2,07 ml 0,01 n NaOH-Verbrauch
Ber. Mol.-Gew.: 148,1 Gef. Mol.-Gew.: 146

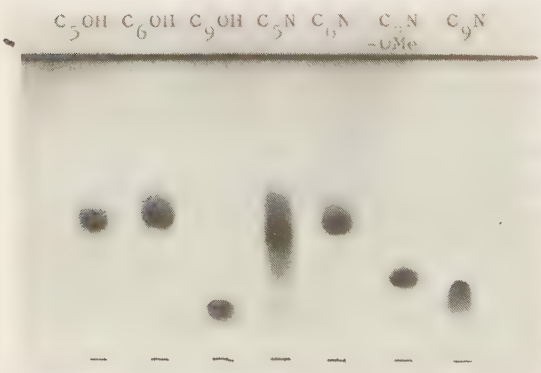
Semicarbazid-Bestimmung:

1 ml Lsg. B wird mit 1 ml Reagenz (1 g Semicarbazid-Hydrochlorid + 1,5 g CH_3COONa 3 H_2O mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt) 30 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 3 ml H_2O verdünnt und bei 250 mµ photometriert.

E = 0,81 - 0,397 µMol/ml = 97 % d. Einw.

Dünnschichtchromatographie: einheitlich (vgl. Abb. 45, C_5OH)

Abb. 45 Dünnschichtchromatogramm der synthetisierten Aldonsäuren (gereinigte Produkte)

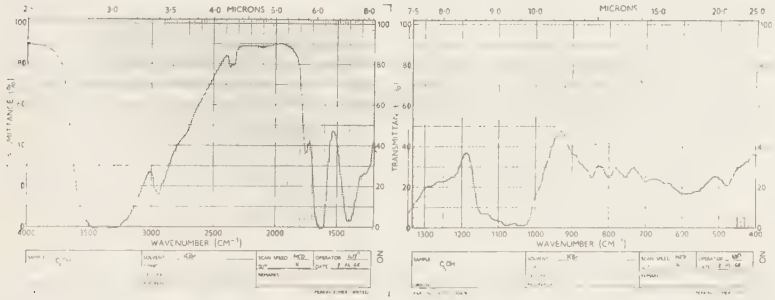


Chromatographie-System II.

H_2SO_4-Färbung

C_5OH:	2-Keto-3-deoxy-pentonsäure
C_6OH:	2-Keto-3-deoxy-hexonsäure
C_9OH:	2-Keto-3-deoxy-nononsäure
C_5N:	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure
C_6N:	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure
C_7N-2-OMe:	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure-ß-methylglykosid
C_9N:	2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-nononsäure (N-Acetyl-neuraminsäure)

Abb. 46 IR-Spektrum der 2-Keto-3-deoxy-pentonsäure KBr - Preßling



Die IR-Spektren der Aldonsäuren im einzelnen zu interpretieren ist nicht sinnvoll, da weder kristallisierte Produkte vorliegen, noch bei der Vielzahl der funktionellen Gruppen einzelne Banden zugeordnet werden können. Auffällig ist jedoch die relative Ähnlichkeit aller Spektren (vgl. Abb. 46-51) und die Verbreiterung der Carboxyl-Carbonyl-Absorption bei den Acetamido-Verbindungen.

Der gleiche Synthese- und Aufarbeitungsweg ist sowohl bei den weiteren 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren wie auch den 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldonsäuren zu beschreiten. Es soll daher im folgenden nur auf die Abweichungen von dem oben angegebenen allgemeinen Verfahren näher eingegangen werden.

5. 2-Keto-3-deoxy-hexonsäure (C_6OH)

4,25 g (15 mMol) Kalium-Salz (vgl. D.II.1) werden mit 0,9 g DL-Glycerinaldehyd (10 mMol) analog der voranstehenden Methode zu 3-Deoxy-3-(tert.-butyloxycarbonyl)-2-en-2-ol-hexonsäure-γ-lacton kondensiert. Die Konfiguration an C-4 und C-5 ist dabei nicht festgelegt.

Rohausbeute: 1,o1 g (6,3 mMol)

Nach der Aufspaltung des Lacton-Ringes und anschließender chromatographischer Reinigung an Dowex 1X8 erhält man ein im dünnschicht-chromatographischen System II. einheitliches Produkt (vgl. Abb. 44, C_6OH und Abb. 45, C_6OH).

Ausbeute nach Trocknen: 448,9 mg (2,52 mMol); bez. auf eingesetzten Glycerinaldehyd: 25,2 % d.Th.

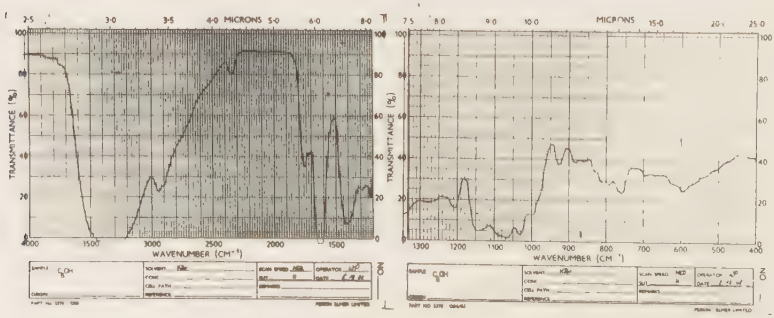
Lösung A: Die Substanz wird in 125 ml Wasser gelöst:
1 ml - 3590 γ (20,16 µMol)

Lösung B: Von Lösung A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt:
1 ml - 71,8 γ (0,403 µMol)

Titration: 2 ml Lsg. A - 4,20 ml 0,01 n NaOH-Verbrauch
Ber. Mol.-Gew. 178 Gef. Mol.-Gew. 171

Semicarbazid-Bestimmung: Lsg. B
E = 0,78 - 0,382 µMol/ml = 94 % d.Einw.

Abb. 47 IR-Spektrum der 2-Keto-3-deoxy-hexonsäure KBr-Preßling



6. 2-Keto-3-deoxy-nononsäure (C_9OH)

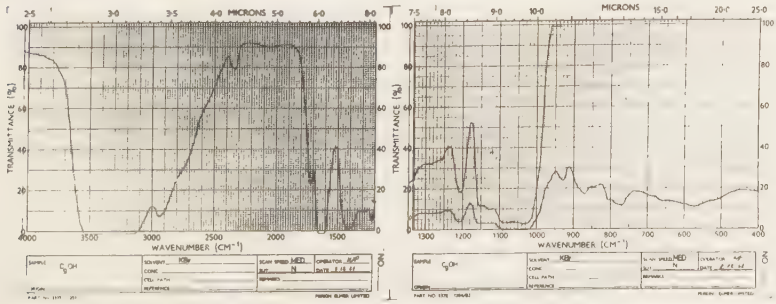
4,25 g (15 mMol) Kalium-Salz (D.II.1) werden mit 1,8 g (10 mMol) D-Mannose entsprechend der Methode wie unter D.II.4 beschrieben zu 3-Deoxy-3-(tert.-butyloxycarbonyl)-2-en-2-ol-nononsäure-γ-lacton kondensiert.
Rohausbeute: 2,63 g (7,5 mMol)
Durch thermische Abspaltung des tert.-Butyloxycarbonyl-Restes entsteht daraus 3-Deoxy-2-en-2-ol-nononsäure-γ-lacton.
Rohausbeute: 1,70 g (6,8 mMol)
Nach der Lacton-Ringöffnung und der anschließenden Reinigung über Dowex 1X8 Anionenaustauscher mit Gradientenelution wird ein dünnschicht-chromatographisch einheitliches Produkt erhalten (vgl. Abb. 45, C_9OH).
Ausbeute nach Trocknen: 528 mg (1,97 mMol); bez. auf eingesetzte D-Mannose: 19,7 % d.Th.

Lösung A: Die Substanz wird in 100 ml Wasser gelöst:
1 ml - 5280 γ (19,68 μMol)
Lösung B: Von Lösung A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt:
1 ml - 15,6 γ (0,394 μMol)

Titration: 2 ml Lsg. A - 3,86 ml 0,01 n NaOH-Verbrauch
Ber. Mol.-Gew. 268 Gef. Mol.-Gew. 274

Semicarbazid-Bestimmung: Lsg. B
E = 0,77 - 0,377 μMol/ml = 95 % d.Einw.

Abb. 48 IR-Spektrum der 2-Keto-3-deoxy-nononsäure KBr-Preßling



7. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure (C_5N)

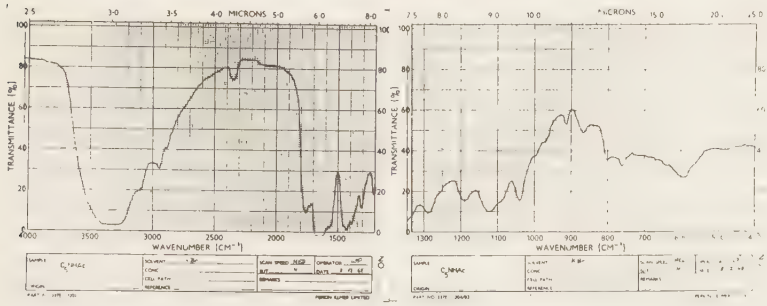
4,25 g (15 mMol) Kalium-Salz werden mit 1,01 g (10 mMol) N-Acetyl-aminoacetaldehyd (D.II.2) entsprechend der beschriebenen Methode zu 3,5-Dideoxy-3-(tert.-butyloxycarbonyl)-2-en-2-ol-5-acetamido-pentonsäure-γ-lacton kondensiert.
Rohausbeute: 2,01 g (7,4 mMol)
Durch thermische Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe entsteht daraus 3,5-Dideoxy-2-en-2-ol-5-acetamido-pentonsäure-γ-lacton.
Rohausbeute: 0,91 g (5,3 mMol)
Es folgt die Lacton-Ringöffnung und die anschließende Reinigungdurch Gradienten-Elution von Dowex 1X8 Anionenaustauscher. Die eluierten Fraktionen können in diesem Fall nicht mit der Aminoff-Methode erfaßt werden. Die Substanz ist jedoch in der "Direkten Ehrlich Reaktion" (vgl. C.IV.1) positiv.
Ausbeute nach Trocknen: 344 mg (1,82 mMol); bez. auf eingesetzten N-Acetyl-aminoacetaldehyd: 18,2 % d.Th.
Dieses Produkt erweist sich dünnschicht-chromatographisch als nicht einheitlich (vgl. Abb. 44, C5N). Die schneller wandernde Substanz ist auf Grund des R_f-Wertes als α-Pyrrolcarbonsäure anzusehen. Sie wird - wie unter D.II.4 für α-Furancarbonsäure beschrieben - durch Gelchromatographie abgetrennt.
Nach einiger Zeit in Lösung zersetzt sich das Produkt; daher zeigen die Chromatogramme (Abb. 45, C_5N) schnell ein Verschmieren der Spots.

Ausbeute der gereinigten Substanz nach Trocknen: 75,8 mg; 44,1 % bez. auf 122 mg eingesetztes Rohprodukt.

Lösung A: Die Substanz wird in 2o ml Wasser gelöst:
1 ml - 3790 γ (20,05 μMol)
Lösung B: Von Lösung A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt:
1 ml - 75,8 γ (0,401 μMol)

Titration: 2 nl Lsg. A - 4,18 ml 0,01 n NaOH-Verbrauch
Ber. Mol.-Gew. 189 Gef. Mol.-Gew. 181

Abb. 49 IR-Spektrum der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure, KBr-Preßling



8. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure (C_6N)

4,25 g (15 mMol) Kalium-Salz werden mit 1,31 g (10 mMol) 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyd (vgl. D.II.3) entsprechend den vorangehenden Synthesen zu 3,5-Dideoxy-3-(tert.-butyloxycarbonyl)-2-en-2-ol-5-acetamido-hexonsäure-γ-lacton kondensiert.
Rohausbeute: 2,348 g (7,8 mMol)
Durch thermische Abspaltung des tert.-Butyloxycarbonyl-Restes entsteht daraus 3,5-Dideoxy-2-en-2-ol-5-acetamido-hexonsäure-γ-lacton.
Rohausbeute: 1,387 g (6,9 mMol)
Nach der Lacton-Ringöffnung und der anschließenden Fraktionierung über Dowex 1X8 Anionenaustauscher wird ein dünnschichtchromatographisch reines Produkt erhalten (vgl. Abb. 44, C_6N).

Ausbeute nach Trocknen: 1,063 g (4,85 mMol); 48,5 % bez. auf eingesetzten 2-Acetamido-2-deoxy-L-glycerinaldehyd.

Lösung A: Die Substanz wird in 250 ml Wasser gelöst:
1 ml - 4252 γ (19,40 μMol)

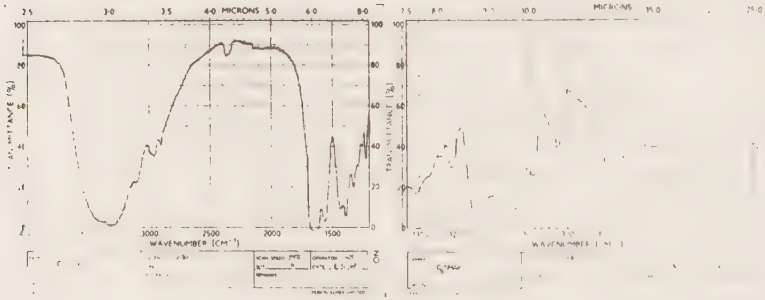
Lösung B: Von Lsg. a wird 1 ml auf 50 ml verdünnt:
1 ml - 85,0 γ (0,388 μMol)

Titration: 2 ml Lsg. A - 4,01 ml 0,01 n NaOH-Verbrauch
Ber. Mol.-Gew. 219 Gef. Mol.-Gew. 212

Semicarbazid-Bestimmung: Lsg. B
E = 0,78 - 0,372 μMol/ml = 95 % d.Einw.

Dünnschicht-Chromatographie: einheitlich (vgl. Abb. 45, C_6N)

Abb. 50 IR-Spektrum der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure, KBr-Preßling



Die angewandte Methode nach Kuhn und Baschang (94) erweist sich als allgemein anwendbar zur Synthese von 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren. Allerdings wird mit dem beschriebenen Aufarbeitungsweg nicht das Ziel verfolgt, die Enantiomeren bzw. Stereoisomeren der einzelnen Produkte voneinander zu trennen.

9. 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure-ß-methylglykosid (C_7N-2-O-Me)

100 mg (310 μMol) N-Acetyl-methoxyneuraminsäure (NeuNAc-ß-methylglykosid) -dargestellt nach l.c. (170) - werden in ca.

5 ml Wasser gelöst, mit 0,1 n $NaCO_3$-Lösung auf p_H 5 eingestellt und auf 4°C abgekühlt. Anschließend fügt man 214 mg (1000 µMol) (ca. 50 % Überschuß) $NaIO_4$, gelöst in 5 ml Wasser, hinzu. Das Oxidationsgemisch wird dann 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln stehen gelassen.

Nach der Oxidation zerstört man das überschüssige Perjodat mit einem Tropfen Glykol, stellt p_h 7 mit 0,1 n $NaCO_3$-Lösung ein und läßt die Lösung dann langsam in eine eisgekühlte wässrige $NaBH_4$-Lösung (150 mg, 4 mMol $NaBH_4$ in 10 ml Wasser) tropfen. Das Gemisch bleibt einige Stunden bei Raumtemperatur stehen und wird dann mit Essigsäure zur Zerstörung des überschüssigen Reduktionsmittels angesäuert. Darauf engt man im Vakuum das gesamte Gemisch auf ca. 10 ml ein und überträgt es auf eine Anionenaustauscher-Säule (50 X 1,8 cm) Dowex 1X8 ($HCOO^-$-Form). Durch Anlegen eines linearen Ameisensäure-Gradienten (Vorratsgefäß 1 l 1 n HCOOH, Mischgefäß 1 l H_2O) wird 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure-ß-methylglykosid als scharfer einheitlicher Peak eluiert. Al analytische Methode dient dabei die Bial-Reaktion (blauvioletter Farbstoff!) und die Dünnschicht-Chromatographie. Die gesammelten Fraktionen werden einige Male mit Methanol zur Trockene eingeengt (zur Entfernung evtl. vorhandener Borsäure) und dann das Produkt aus Wasser gefriertrocknet.

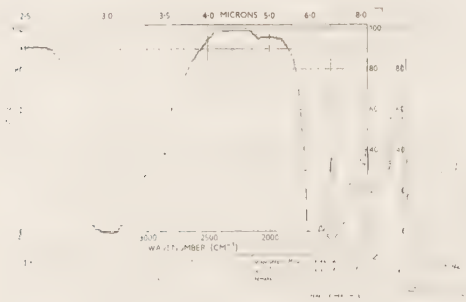
Ausbeute nach Trocknen: 63,6 mg (242 µMol); 78,2 % bezogen auf eingesetzte N-Acetyl-methoxyneuraminsäure.

Lösung A: Die Substanz wird in genau 12 ml Wasser gelöst:
1 ml - 5300 γ (20,17 µMol)
Lösung B: von Lsg. A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt:
1 ml - 106 γ (0,403 µMol)

Titration: 2 ml Lsg. A - 3,89 ml 0,01 n NaOH-Verbrauch
Ber. Mol.-Gew. 263 Gef. Mol.-Gew. 272

Dünnschicht-Chromatographie: einheitlich (Abb. 45, C_7N-OMe)

Abb. 51 IR-Spektrum des 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure-ß-methylglykosids, KBr - Preßling



1o. Aldehyde

Die folgenden 3 Reaktionen sind so angelegt, daß jeweils die für die UV-Spektrometrie erforderlichen Konzentrationen (ca. 20 µMol/ml bzw. 0,4 µMol/ml) erhalten werden (vgl. D.IV.2).

a) Malondialdehyd:
67,1 mg (408,6 µMol) 1,1,3,3-Tetramethoxypropan werden in 20 ml 0,1 n HCl gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Dies ergibt einen Gehalt an Aldehyd:

Lösung A: 20,43 µMol/ml
Lösung B: Von Lsg. A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt: 0,408 µMol/ml

b) Succindialdehyd:
65,7 mg (497,2 µMol) 1,4-Dimethoxy-tetrahydrofuran werden in 20 ml 0,1 n HCl gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Dies ergibt einen Gehalt an Aldehyd:

Lösung A: 24,86 µMol/ml
Lösung B: Von Lsg. A. wird 1 ml auf 50 ml verdünnt: 0,497 µMol/ml

c) Maleindialdehyd:

53,5 mg (411 µMol) 1,4-Dimethoxy-1,4-dihydro-furan werden in 20 ml 0,1 n HCl gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Dies ergibt einen Gehalt an Aldehyd:

Lösung A: 20,55 µMol/ml
Lösung B: Von Lsg. A wird 1 ml auf 50 ml verdünnt: 0,411 µMol/ml

d) Glutacondialdehyd:

Zu 79 g Pyridin (1 Mol), gelöst in 200 ml Tetrachlorkohlenstoff, wird unter intensiver Kühlung mit einem Eisbad langsam 58 g (0,5 Mol) Chlorsulfonsäure zugetropft. Das entstandene Produkt wird auf einer Nutsche vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wird es sofort gut mit Eiswasser verrieben, um das beigemengte Pyridin-Hydrochlorid zu entfernen. Man filtriert, wäscht mit Eiswasser nach und trocknet auf einem Tonteller an der Luft.

Ausbeute: 68 g Pyridin-N-sulfonsäure; 86 % d.Th.

4 g (50 mMol) von diesem Produkt werden unter guter Kühlung - Eis-Kochsalz-Gemisch - mit vorgekühlter Natronlauge (7 g, 175 mMol, NaOH in 30 ml H_2O) in einer Schale verrieben. Man läßt ca. 20 Min. in der Kälte stehen und erhitzt dann wenige Minuten auf ungefähr 50°C. Die anfangs gelbe Reaktionsmasse färbt sich braun, bildet eine Lösung und erstarrt gleich darauf zum Kristallbrei. Die abgenutschten Kristalle werden auf Ton abgepresst und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3,2 g Glutacondialdehyd-Na-Salz; 53 % d.Th.

11. α-Pyrrolcarbonsäure

8,1 g (0,33 Mol) Magnesium-Späne werden in 300 ml trockenem Äther mit 40 g (0,36 Mol) Äthylbromid zur Grignard-Verbindung umgesetzt. In diese Reagenz wird bei 0°C eine Lösung von 13,4 g (0,2 Mol) Pyrrol in 100 ml Äther zugetropft. Man läßt eine Stunde nachrühren und leitet dann unter Kühlen eine Stunde lang einen langsamen CO_2-Strom durch die Lösung. Ein Überschuß (ca. 500 ml) 1 n NaOH wird hinzugefügt, das Gemisch zum Aufsieden erhitzt und - nach Abziehen des Äthers im Vakuum - das ausgefallene $Mg(OH)_2$ abfiltriert. Das Filtrat wird mit Aktivkohle behandelt (ca. 10 g), auf ein kleines Volumen eingeengt, gekühlt und langsam mit 1 n HCl schwach angesäuert. Dabei fällt der größte Teil des Produktes aus. Weiteres Produkt läßt sich durch vollständiges Ansäuern und Extrahieren der Lösung mit Äther gewinnen.

Ausbeute: 6,8 g α-Pyrrolcarbonsäure; 31 % d.Th.

D. III. Analytische Methoden

a) Dünnschicht-Chromatographie:

System I: Stationäre Phase: Kieselgel H, Merck
Fließmittel: Propanol/Wasser (8:2, v/v)

System II: Stationäre Phase: Kieselgel H, Merck
Fließmittel: Propanol/Wasser (7:3, v/v)

Anfärbung: H_2SO_4-Dichromat,
Perjodat/Thiobarbitursäure
Perjodat/Benzidin
DMAB / HCl

b) IR-Spektrometrie

Film: ca. 0,025 mm

KBr - Preßling: Etwa 1 mg Substanz wird mit 300 mg KBr in 20 ml Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Das amorphe Pulver wird mehrere Stunden bei 50°C über P_2O_5 im Vakuum gegetrocknet und dann zu einem Preßling verarbeitet.

Gerät: Perkin Elmer 337 Grating Spectrophotometer

c) UV-Spektrometrie

Semicarbazid-Bestimmung: wie unter D.II.4 beschrieben

Gerät: Spektralphotometer PMQ 2, Zeiss, Oberkochem

Aminoff- und Bial/Svennerholm- Bestimmungen:
wie unter C.IV.2 bzw. C.IV.4 beschrieben

Gerät: Automatisches UV-Spektralphotometer DMR 21, Ziss, Oberkochem

D. IV. Analytische Ergebnisse

1. Aminoff Bestimmung

Die synthetisierten 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren werden in geeigneter Konzentration (ca. 0,1 µMol/o,5 ml) der Perjodat/Thiobarbitursäure Reaktion entsprechend den von Aminoff angegebenen Bedingungen (vgl. C.IV.4) unterworfen. Die molaren Extinktions-Koeffizienten sind in der folgenden Tabelle angegeben:

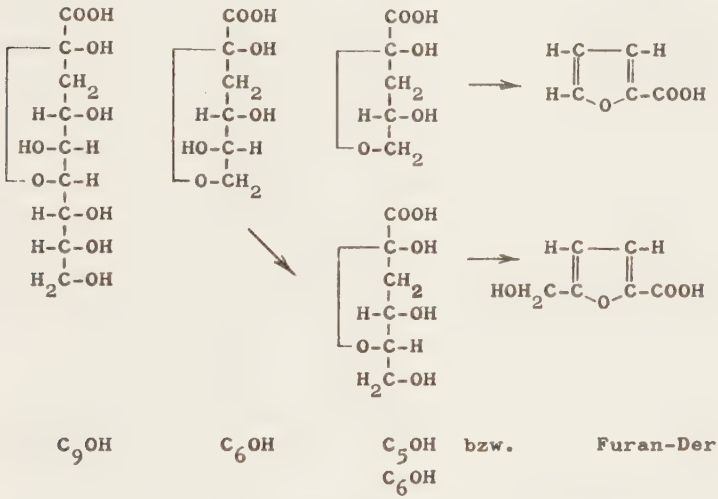
Tab. 2 Aminoff Reaktion der synthetisierten Produkte

Substanz	Konzentration in µMol/0,5 ml	mol. Extinktion bei 550 mµ	mol. Extinktion bei 550 mµ (Lösung 4 Wochen bei 20°C, p_H7)
C_9N	0,101	65.300	
C_7N-2-OMe	0,202	820	
C_6N	0,195	640	
C_5N	0,200	325	
C_9OH	0,099	70.200	69.900
C_6OH	0,101	70.100	19.060
C_5OH	0,102	68.700	6.030

In der 4. Spalte der Tabelle 2 sind die molaren Extinktions-Koeffizienten für C_9OH, C_6OH und C_5OH aufgeführt, die die Standard-Lösungen ergeben, wenn sie bei p_H=7 4 Wochen lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
Dies ist ein Beweis für die zunehmende Labilität bei Kettenverkürzung in dieser homologen Reihe. Während C_9OH unter den obigen Bedingungen noch unverändert bleibt, wandelt sich die Pyranose-Struktur von C_6OH, wahrscheinlich infolge des Fehlens eines Substituenten an C-6 (vgl. Abb. 52), leicht in die

Furanose-Form um. Die sich anschließende Dehydratisierung des Fünfringes führt sodann bei C_6OH wie auch bei C_5OH zur rapiden Abnahme der Extinktion in der Aminoff Reaktion. Zur gleichen Feststellung sind auch L. Szabo u. Mitarbeiter gekommen (pers. Mitteilung).

Abb. 52 Zur Stabilität der 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren



In Abb. 53 ist das gleiche Ergebnis im Gesamtspektrum wiedergegeben. Der qualitative Kurvenverlauf ist jedoch weiterhin identisch, auch mit dem der N-Acetyl-neuraminsäure (vgl. Abb. 54). Die drei N-haltigen Analogen ergeben keine Absorption.

Abb. 53 UV-Spektrum, Aminoff Reaktion: C_9OH, C_6OH und C_5OH
Konzentration: 0,1 µMol/0,5 ml
Lösungen: 4 Wochen, p_H 7, Raumtemperatur

Abb. 54 UV-Spektrum, Aminoff Reaktion: C_9N (0,1 µMol/0,5 ml), C_7N-2-OMe, C_6N, C_5N (je 0,2 µMol/0,5 ml)

Abb. 53

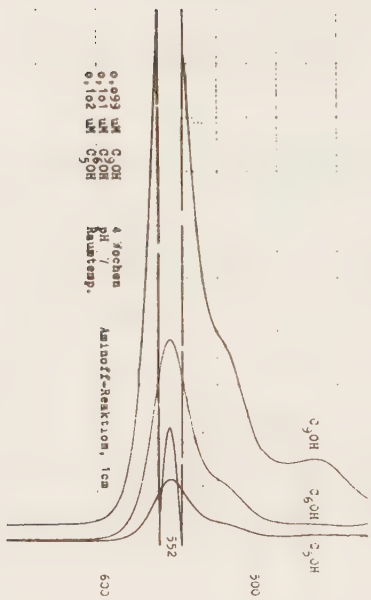
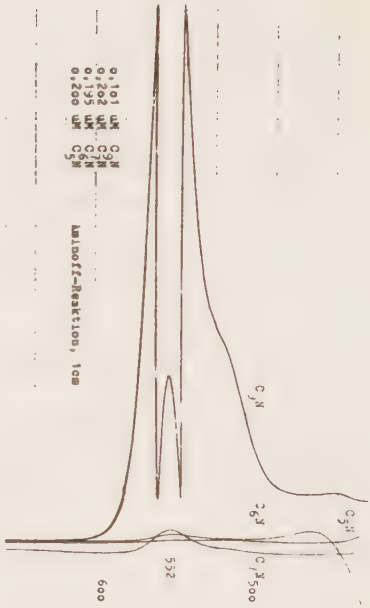


Abb. 54



2. Bial/Svennerholm Reaktion

Während bei der Perjodat/Thiobarbitursäure Bestimmung auf Grund des bekannten Mechanismus der Reaktion außer mit den synthetisierten 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren keine weiteren Untersuchungen erforderlich sind, ist bei der Bial/Svennerholm Reaktion eine Reihe von Parametern zu berücksichtigen:

a) Die Hydroxy-Phenol-Komponente reagiert praktisch mit allen ungesättigten und aromatischen Aldehyden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, eine große Anzahl von Substanzen zu testen, um eine Aussage über die Reaktionsspezifität machen zu können. Aldehyde, Aldosen, 2-Deoxyyldosen, verschiedene spezielle Zucker, bekannte Abbau-Produkte von Zuckern

und die synthetisierten Substanzen werden in den folgenden Tabellen zu Gruppen zusammengefaßt.

b) Das molare Verhältnis von Probe zu Reagenz hat einen entscheidenden Einfluß auf das sich bildende Chromophore System. Nach den bisherigen Kenntnissen (151) liegt das Optimumder Farbstoff-Entwicklung für Neuraminsäure bei einem Verhältnis von Orcin bzw. Resorcin zu Neuraminsäure wie 16 µMol / 0,4 µMol (40:1) (Lösungen B!) pro Bestimmung. Andererseits kann sich nach Svennerholm (151) das Spektrum völlig ändern, wenn die Proben (z.B. Fruktose) in höherer Konzentration bestimmt werden. Aus diesem Grunde werden alle Bestimmungen außerdem bei eimem Molverhältnis von etwa 16 µMol / 20 µMol (ca. 1:1) (Lösungen A!) durchgeführt. Bei den Bestimmungen der höher konzentrierten Lösungen von Maleindialdehyd, C_5N, C_6N und C_7N-2-OMe entsteht ein Niederschlag, der erst nach weiterer Verdünnung des alkoholischen Extraktes die Aufnahme des qualitativen Spektrums gestattet.

c) Die Metallionen-Konzentration im Reagenz liegt bei 1 µMol pro Analysenansatz und stellt nach Svennerholm (151) den optimalen Wert dar. Er wird auch in diesen Untersuchungen eingehalten. Cu^{++} und Fe^{+++} haben unterschiedslos den gleichen Effekt einer intensiveren Farbstoff-Entwicklung. Die Lage der Maxima bleibt in jedem Falle unverändert.

d) Die Art des Hydroxy-Phenols hat auf den Reaktionsverlauf einen weiteren Einfluß: Sowohl die Lage der Absorptions-Maxima - sie verschieben sich bei Anwendung von Resorcin anstelle von Orcin in den meisten Fällen um ca. 10 mµ in den langwelligen Bereich - als auch die Höhe der Absorption der Chromophore sind unterschiedlich. Um einen Vergleich unter einheitlichen Bedingungen ziehen zu können, wird in allen Fällen nur das Orcin benutzt (Bial-Bestimmung). Der Gebrauch von Resorcin (Svennerholm-Bestimmung) ist nur auf die "Neuraminsäure-positiven" Substanzen C_9N und C_7N-2-OMe beschränkt.

e) Die synthetisierte Verbindung C_7N-2-OMe besitzt im Gegensatz zu den analogen Produkten nicht die 2-Keto-Gruppierung; diese ist glykosidisch maskiert. Unter den sauren Bedingungen der Bial-Bestimmung wird sie jedoch - analog den Neuraminsäure-glykosiden -sofort freigesetzt. Aus diesem Grunde ist sie dabei auch als 2-Keto-3-deoxy-aldonsäure anzusehen.

Tab. 3 Aldehyde, Bial-Bestimmung

	Lösung B (0,4 µMol/ml)		Lösung A (20 µMol/ml)	
	λmax	ε max	λmax	ε max
Acrolein	576	2000	580	45
Crotonaldehyd	403	3500	406	310
Glyoxal		<	570	195
Malondialdehyd	578	10100	662 585	195 150
Glutacondialdehyd	576	5700	582	360
Maleindialdehyd	695	3600	710	Nd.
Succindialdehyd		<		<

Tab. 4 Aldosen, Bial-Bestimmung, Lösung B (0,4 µMol/ml)

	λ max	ε max
Glykolaldehyd	675 438	580 485
Glycerinaldehyd	675 438	2575 1720
Erythrose	675 438	400 1210
Ribose	675	3230
Arabinose	675	1930
Lyxose	675	3540

Tab. 5 2-Deoxy-aldosen, Bial-Bestimmung
Lösung B

	λ max	ε max
2-Deoxy-glucose	645 570 420	1650 1590 2020
2-Deoxy-galaktose	645 570 420	1550 1725 2110
2-Deoxy-ribose	645 610	770 680

Tab. 6 Verschiedene Zucker, Bial-Bestimmung

	Lösung B		Lösung A	
	λ max	ε max	λ max	ε max
Fucose			670 410	30 60
Fructose	676 560	910 1310	620	110
Glucuronsäure	672	1525	670 619	70 72
N-Ac-glucosamin	560	15		

Tab. 7 Zucker -Abbauprodukte, Bial-Bestimmung
Lösung B

	λ max	ε max
5-Hydroxymethyl-furfural	674 557	790 2490
Furfural	672 580	3590 2730
Furfurylalkohol	670 590	580 630
Silvan	496	1o1o

Abb. 8 Synthese - Produkte, Bial-Bestimmung

	Lösung B		Lösung A	
	λ max	ε max	λ max	ε max
C_9OH	570	510	570	195
C_6OH	570	200	570	65
C_5OH	570	250	570	<
C_9N	582	5190		
C_7N-2-OMe	603	7380	470	Nd.
C_6N	469	7300	475	Nd.
C_5N	500-460	1430	448	Nd.
α-Pyrrolcarbonsäure	460	1890		
Pyrrol	460	1700		

Die in der Tabelle 8 angegebenen Extinktionswerte für C_5OH, C_6OH und C_9OH verändern sich nicht bei Anwesenheit von Ammonsalzen.

Da die Maxima der UV-Absorption nicht allein eine Aussage über die chromophore Gruppe gestatten, sondern besonders auch der gesamte Kurvenverlauf mit eventuellen Schultern zu beachten ist, müssen die für die in C.V.3 gemachten Aussagen wichtigen Spektren als Ganzes abgebildet werden.

Abb. 55 0,405 µMol/ml C_9N (NeuNAc),
a) Bial-Bestimmung , b) Svennerholm-Bestimmung

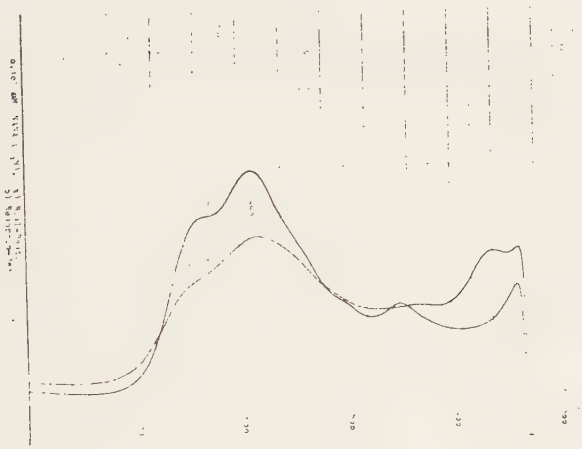


Abb. 56 0,403 µMol/ml C_7N-2-OMe
a) Bial-Bestimmung, b) Svennerholm-Bestimmung

Abb. 57 0,388 µMol/ml C_6N, Bial-Bestimmung, 2 cm Küvette

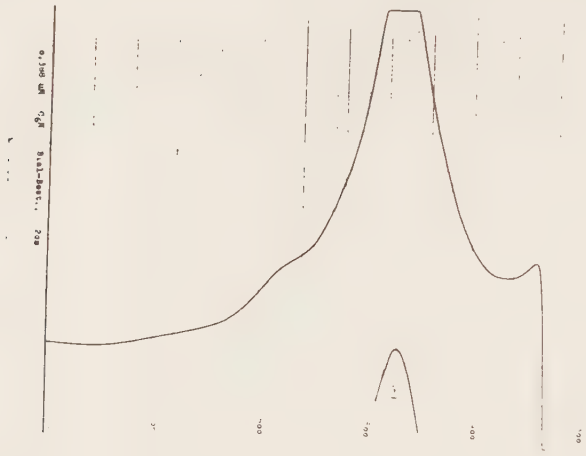


Abb. 58 0,401 µMol/ml C_5N, Bial-Best., 2 cm Küvette

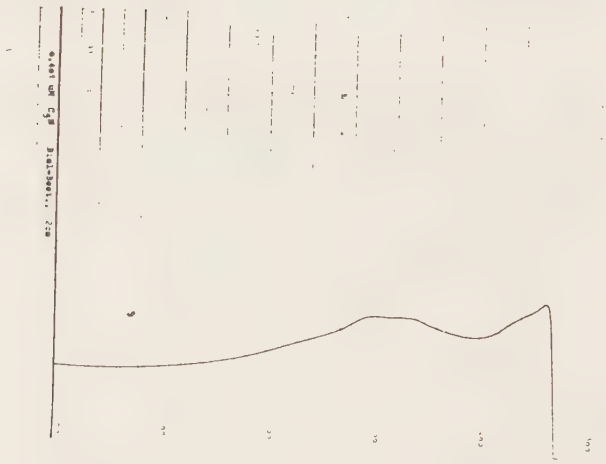


Abb. 59 a) 0,515 uMol/ml Pyrrol,
b) 0,396 µMol/ml α-Pyrrolcarbonsäure,
Bial-Bestimmung

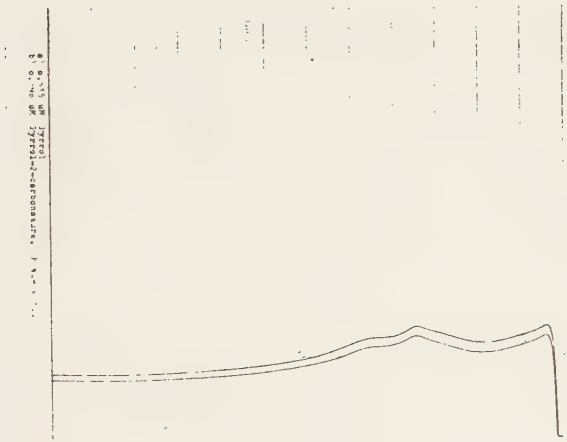


Abb. 60 20,17 µMol/ml C_7N-2-OMe, Bial-Bestimmung
Nd. ausverdünnt

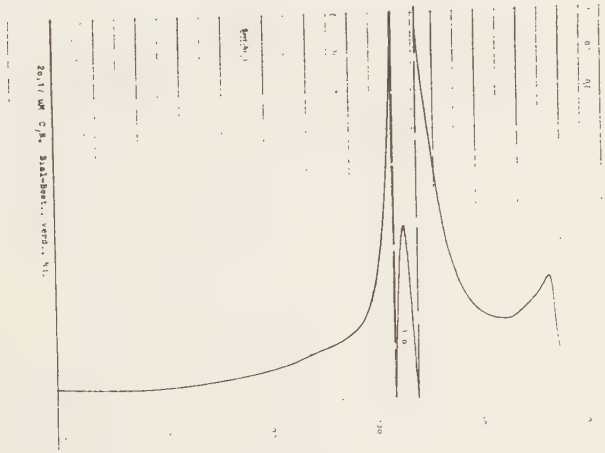


Abb. 61 19,4 µMol/ml C_6N, Bial-Bestimmung
Nd. ausverdünnt

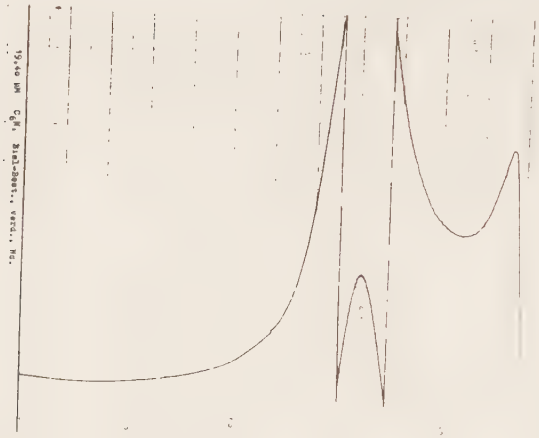


Abb. 62 20,05 µMol/ml C_5N, Bial-Bestimmung
Nd. ausverdünnt

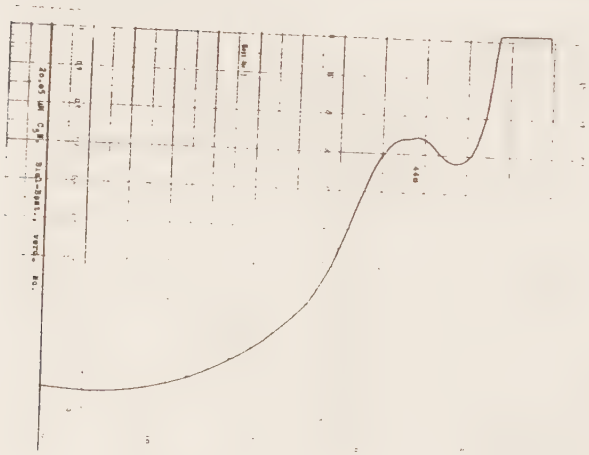


Abb. 63 0,518 µMol/ml Furfurylalkohol, Bial-Bestimmung, 2 cm Küvette

Abb. 64 0,407 µMol/ml Furfurol, Bial-Bestimmung 2 cm Küvette

Abb. 65 0,412 µMol/ml 5-Hydroxymethyl-furfurol, Bial-Bestimmung, 2 cm Küvette

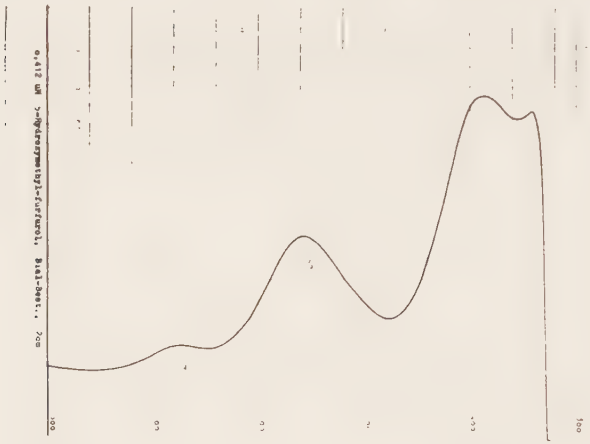


Abb. 66 a) 0,408 µMol/ml C_5OH,
b) 0,403 µMol/ml C_6OH,
c) 0,394 µMol/ml C_9OH, Bial-Bestimmung, 2 cm

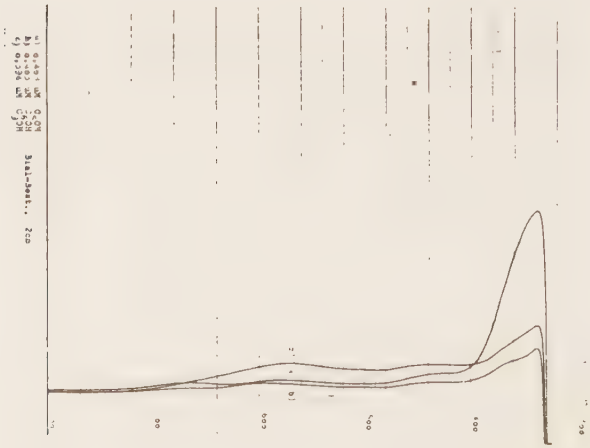


Abb. 67 a) 20,42 µMol/ml C_5OH
b) 20,16 µMol/ml C_6OH
c) 19,70 µMol/ml C_9OH, Bial-Best., 2 cm Küvette

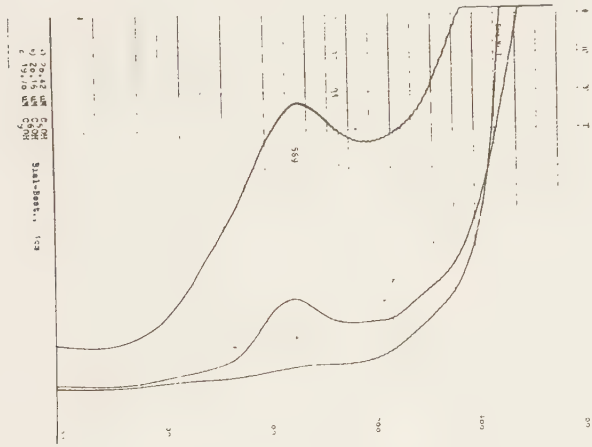


Abb. 68 0,408 µMol/ml Malondialdehyd, Bial-Bestimmung, 2 cm Küvette

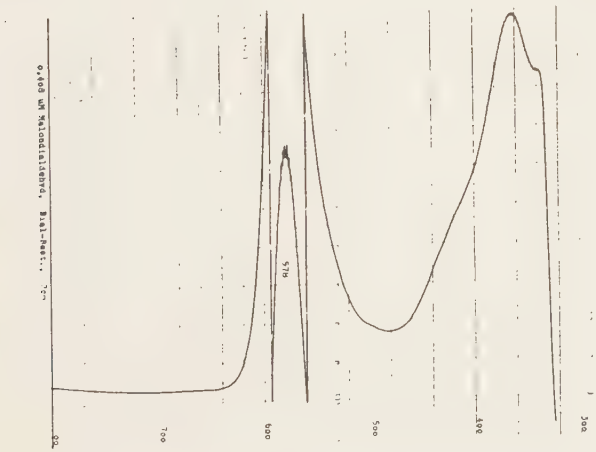
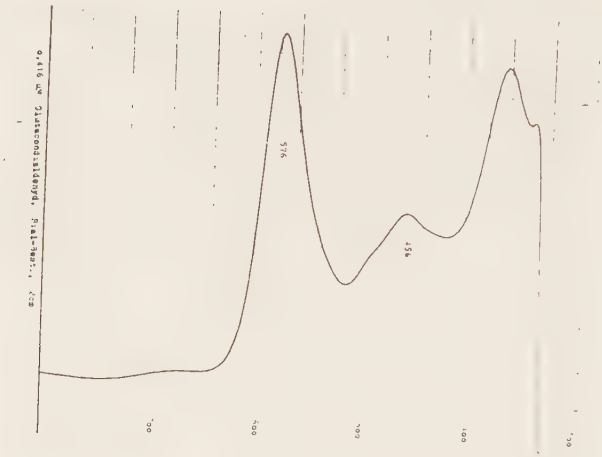


Abb. 69 0,416 µMol/ml Glutacondialdehyd, Bial-Best., 2 cm Küvette

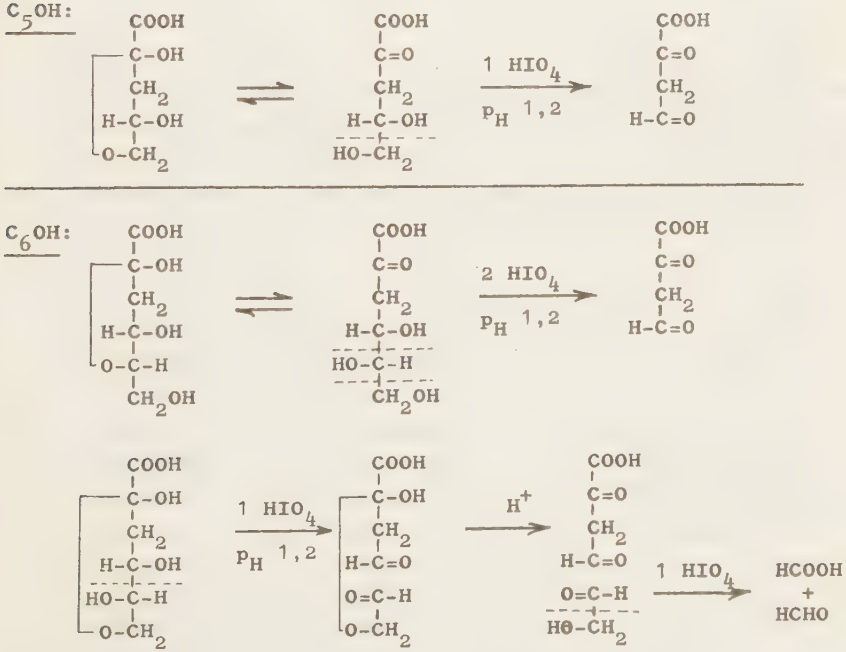


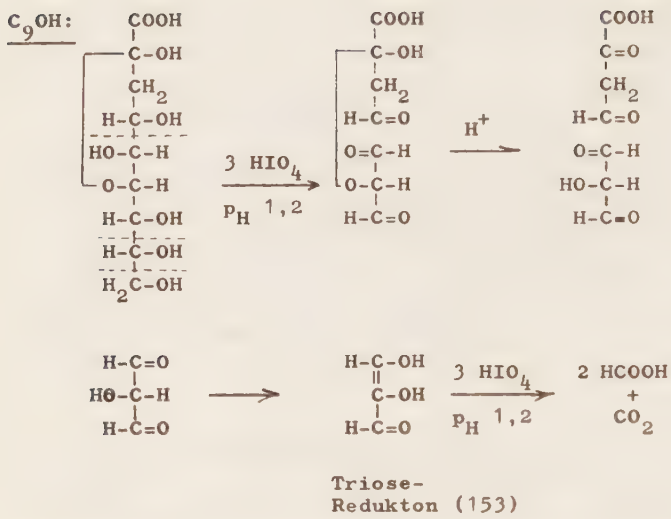
D. V. Diskussion

1. Chromogen-Bildung der Aminoff/Warren Reaktion

Der von Paerels und Schut (131) erarbeitete Reaktions-Mechanismus der Aminoff/Warren Bestimmung (vgl. C.IV.4) ist an Hand der synthetisierten Aldonsäuren erneut bestätigt. In den folgenden Abbildungen sind die Wege, die zur Ausbildung des Chromogens führen, bzw. seine Entstehung nicht erlauben, auf Grund der erzielten analytischen Ergebnisse (vgl. D.IV.1) zu beschreiben:

Abb. 70 Bildung des Aminoff/Warren Chromogens aus 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren





Die drei synthetisierten 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren ergeben in gleicher Weise eine positive Aminoff/Warren Reaktion. Bei C_5OH führt die Oxidation mit 1 Äquivalent HIO_4 erst nach Öffnung des Furanose-Ringes zum Chromophor ß-Formyl-brenztraubensäure (HIO_4-Langsam-Verbrauch).

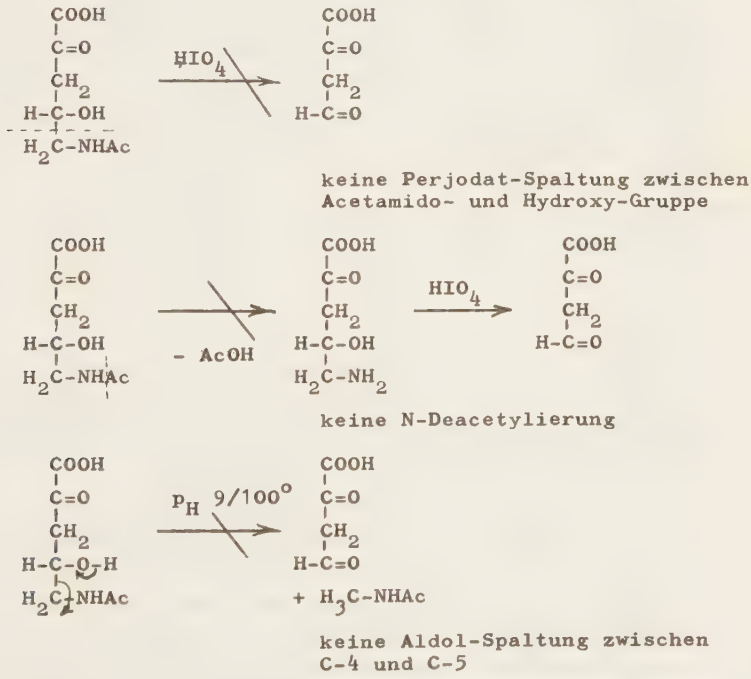
Bei C_6OH ist von den zwei Ringformen - Pyranose und Furanose - auszugehen. Die Furanose wird erst nach Ring-Öffnung mit 2 Äquivalenten HIO_4 (Langsam-Verbrauch) zum Chromogen oxidiert, während die Pyranose sofort zwischen C-4 und C-5 durch 1 Äquivalent HIO_4 (Schnell-Verbrauch) gespalten wird. Nach der anschließenden Hydrolyse des Zwischenproduktes zu Chromogen und Glykolaldehyd wird letzterer durch ein weiteres Äuqivalent HIO_4 (Langsam-Verbrauch) zerstört.

Eine vergleichbare Reaktionsfolge läuft bei C_9OH ab: Durch Spaltung zwischen C-4 und C-5 und zusätzlich C-7 und C-8, bzw. C-8 und C-9 durch 3 Äquivalente HIO_4 (Schnell-Verbrauch) wird ein Zwischenprodukt gebildet, das zu Chromogen und

Hydroxymalondialdehyd führt. Letzterer unterliegt über das Triose-Redukton dem weiteren Abbau (3 HIO_4 - Langsam-Verbrauch) (153).

In der Reihe der 5-Acetamido-aldonsäuren liefern nur die Glieder mit einer Kettenlänge von 7 und mehr C-Atomen in der Aminoff/Warren Reaktion als Chromogen ß-Formyl-brenztraubensäure.

Abb. 71 Bildung des Aminoff/Warren Chromogens aus 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldonsäuren



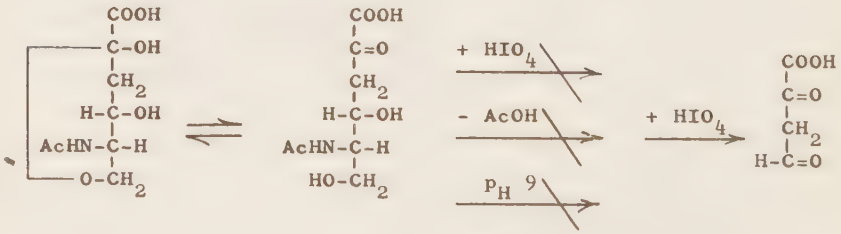
Bei C_5N ist keine Chromogen-Bildung zu beobachten. Daher können folgende Aussagen getroffen werden:

a) Es ist einerseits keine Perjodat-Spaltung zwischen C-4 und C-5 möglich.

b) Andererseits kann keine De-acetylierung des Stickstoffs unter den Reaktionsbedingungen eintreten. Falls sie nämlich zustande käme, würde die dann frei werdende vicinale Amino-Hydroxy-Gruppierung wieder den oxidativen Weg zum Chromogen freigeben.
Dieser Entacylierungs-Schritt mit nachfolgender HIO_4-Oxidation ist ursprünglich von Warren (161) postuliert worden. Aber auch heute noch ist er bisweilen in der Literatur (53) diskutiert. Er kann auf Grund des negativen Ausfalls der Aminoff/Warren Reaktion bei C_5N und C_6N (siehe unten) endgültig als falsch angesehen werden.

c) Weiterhin ist im Alkali-Schritt eine Aldol-Spaltung zwischen C-4 und C-5 zu Chromogen und N-Acetyl-methylamin ausgeschlossen; es fehlt nämlich die Möglichkeit zur Stabilisierung eines Carbanions an C-5.

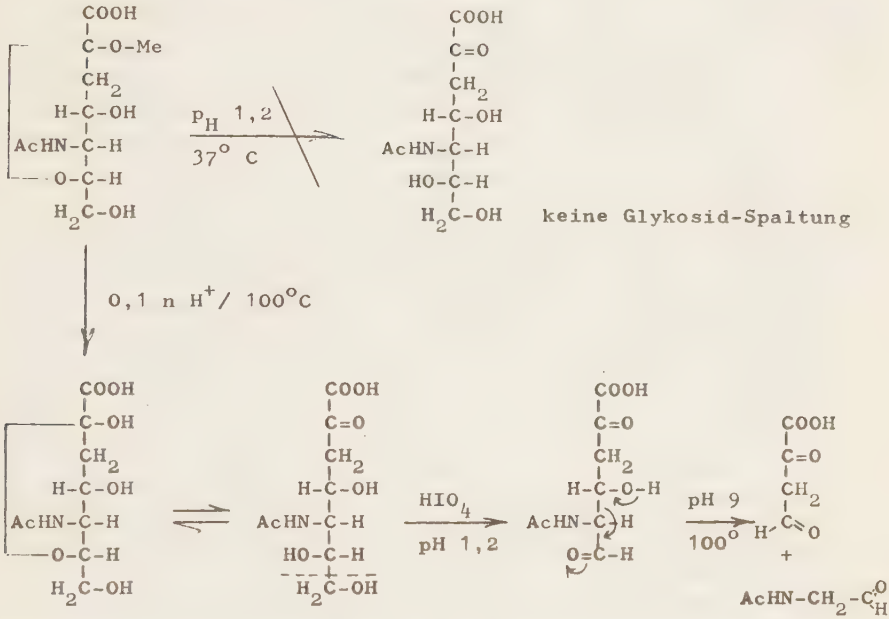
Abb. 71 Fortsetzung: C_6N



a) keine HIO_4-Oxidation C-4/C-5
b) keine N-De-acylierung
c) keine Aldolspaltung C-4/C-5

Für C_6N ist aus den gleichen, vorstehend geschilderten drei Gründen eine Chromogen-Bildung blockiert. (vgl. Abb. 71, C_6N).

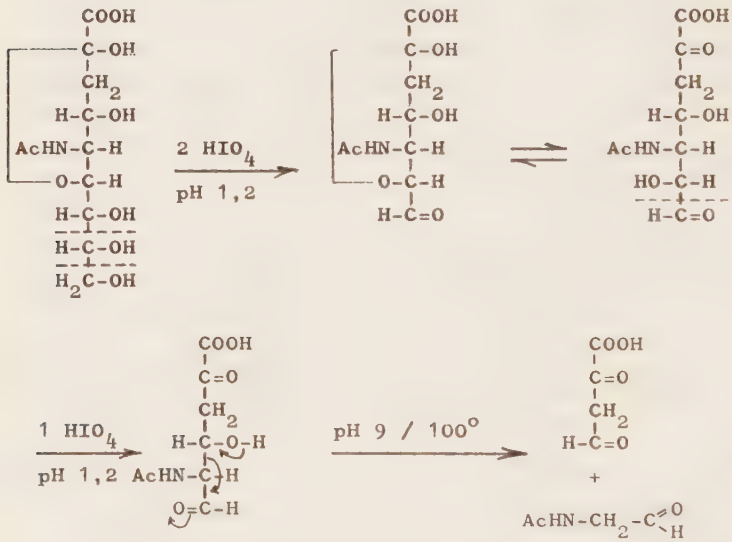
Abb. 71 Fortsetzung: C_7N-2-O-Me



Die Verbindung C_7N-2-O-Me unterscheidet sich als Glykosid einer 5-Acetamido-aldolusonsäure von den anderen Substanzen dieser Reihe. Da die Glykosid-Struktur unter den Bedingungen der Perjodat-Oxidation (pH 1,2 / 37°) erhalten bleibt, ist keine Möglichkeit zu weiteren Reaktionen gegeben.
Wird jedoch der Aminoff/Warren Reaktion ein Hydrolyse-Schritt vorgeschaltet, so tritt Chromogen-Bildung auf (100). Das Glykosid wird zur freien Keto-acetamido-aldonsäure gespalten, die nach Umwandlung in die offene Form durch 1 Äquivalent HIO_4 (Langsam-Verbrauch) zwischen C-6 und C-7 gespalten wird. Die entstehende Aldehyd-Gruppe an C-6 vermag nun im anschliessenden alkalischen Milieu (pH 9 / 100°) der Reaktion ein Carbanion an C-5 zu stabilisieren , so daß Aldolspaltung zwischen

C-4 und C-5 eintreten kann: Als Reaktions-Produkte erhält man das Chromogen ß-Formyl-brenztraubensäure und N-Acetyl-aminoacetaldehyd.

Abb. 71 Fortsetzung: C_9N (NeuNAc)



Der gleiche Reaktionsverlauf kennzeichnet die Chromogen-Bildung der N-Acetyl-neuraminsäure (C_9N).
Auch glykosidisch gebundene Neuraminsäure ergibt wie C_7N-2-OMe erst nach Hydrolyse das Chromogen der Aminoff/Warren Reaktion.

2. Chromogen-Bildung der Bial/Svennerholm Reaktion

Das stark saure Milieu, der schwer zu fassende Einfluß der Metallionen und die Instabilität des Chromogens und des Chromophors bereiten große Schwierigkeiten für die Aufklärung des Reaktions-Mechanismus dieser Bestimmungsmethode für Neuraminsäure.

Grundsätzlich muß davon ausgegangen werden, daß unter den Reaktions-Bedingungen (ca. 5 n HCl / 100°C / 15 Min.) alle labilen Substituenten und Formen des Neuraminsäure-Moleküls hydrolytisch gespalten werden. Es sind dies: Neuraminsäure-Ester, Neuraminsäure-Lacton, Neuraminsäure-Glykoside, O-Acyl-Derivate und Acetal-Gruppierungen. Nicht jedoch werden Äther-Gruppen, wie in NeuNGl-8-O-Me und Permethyl-neuraminsäure (Synthese H.J.Schoop, Bochum, unveröffentlicht) gespalten. Man erhält so in jedem Falle - bis auf die veräthertem Neuraminsäuren - primär die freien Acylneuraminsäuren, so daß die Chromogen-Bildung von diesen ihren Ausgang nimmt.

Da sich die N-Substituenten entscheidend auf die Chromophor-Ausbeute auswirken (vgl. Tab. 9), muß im weiteren Reaktionsverlauf eine Amid-Spaltung stattfinden. Denn sterische Ein-

Tab. 9 Chromogen-Ausbeute dei verschiedener N-Substitution Bial/Svennerholm Reaktion

	N-Substituent	pK-Wert	Farbstoff-Ausb.
NeuN-2-O-Me	——	——	100 %
NeuNGl	$HO-CH_2-C\overset{O}{<}$	3,8	94 %
NeuNCbo	$Ø-CH_2-O-C\overset{O}{<}$	3,9	81 %
NeuNAc	$CH_3-C\overset{O}{<}$	4,8	79 %
NeuNPropionyl	$CH_3-CH_2-C\overset{O}{<}$	4,9	77 %
NeuNButyryl	$CH_3-CH_2-CH_2-C\overset{O}{<}$	4,8	49 %
NeuNBenzoyl	$Ø-C\overset{O}{<}$	4,2	32 %

flüsse sind nicht die Ursache für diese Erscheinung, sondern hauptsächlich nur die Acidität der zugrunde liegenden Säure: Mit der Zunahme des pK - Wertes wird die Farbstoff-Entwicklung geringer. In gewissem Umfang spielt wohl auch der abnehmende hydrophile Charakter der Substituenten eine Rolle.

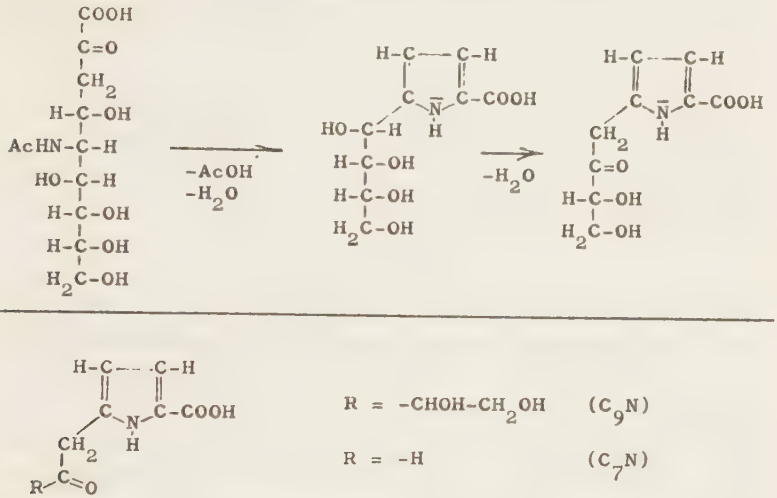
Über die Ursachen für die N-Deacylierung der Neuraminsäure im sauren Milieu sind bislang keinerlei Angaben gemacht. Der als Arbeitshypothese (C.V.2, Abb. 21) diskutierte Mechanismus gibt einige Hinweise auf die mögliche Reaktionsfolge: Ringschluß zum Pyrrolidin-Derivat $\longrightarrow$ N-Deacylierung $\longrightarrow$ Dehydratisierung zum Pyrrol-Derivat. Experimente zur Untersuchung dieses Ablaufes sind in Vorbereitung. Auch im alkalischen Bereich vollzieht sich die N-Deacylierung mit großer Geschwindigkeit (H.J.Schoop, unveröffentlicht) und ist wohl über einen ähnlichen Mechanismus zu erklären.

Für das Vorhandensein von Pyrrol-Körpern als Zwischenstufe des Abbaus der Neuraminsäure gibt es folgende Beweise:
a) Nach Alkali-Behandlung wird α-Pyrrolcarbonsäure isoliert;
b) Nach Säure-Behandlung tritt schon in der Kälte Färbung mit dem Ehrlich'schen Aldehyd auf (vgl. Abb. 23). Diese Reaktion wird nur bei Pyrrolen beobachtet.

Das Zwischen-Produkt des Säure-Abbaus der Neuraminsäure ist somit als 5-Tetrahydroxybutyl-pyrrol-2-carbonsäure (vgl. Abb. 72) anzusehen, aus der sich durch nachfolgende Dehydratisierung 5-(2-Keto-3,4-dihydroxy-butyl)-pyrrol-2-carbonsäure bildet. Auf Grund der nachfolgend diskutierten experimentellen Ergebnisse stellt diese, offensichtlich sehr labile, Substanz das eigentliche Chromogen des Säure-Abbaus dar.

Zur Ausbildung des postulierten Chromogens und des sich daraus bildenden Chromophors der Neuraminsäure sind folgende Feststellungen zu treffen:

Abb. 72 Chromogen-Bildung der Neuraminsäure



a) Der primär erfolgende Ringschluß zum Pyrrol ist nur bei Anwesenheit einer Amino-Gruppe an C-5, also in γ-Stellung zur Carbonyl-Gruppe an C-2 möglich. Daher reagieren die 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren C_5OH, C_6OH und C_9OH nicht in der Direkten Ehrlich Reaktion und der Bial/Svennerholm Reaktion. Auch ein Zusatz von Ammon-Salzen zum Testgemisch liefert keine Farbbildung, so daß eine Abspaltung der NH_2-Gruppe mit anschließender Kondensation zu Orcein-Farbstoffen ausgeschlossen werden kann.

b) Eine Dehydratisierung des Substituenten an C-5 der Pyrrol-2-carbonsäure ist nur denkbar bei einer Seitenketten-Länge von mindestens zwei CHOH-Gruppen (vgl. Abb. 72). Daraus folgt, daß nur 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldonsäuren die Bial/Svennerholm Reaktion ergeben, die insgesamt 7 und mehr C-Atome in der Kette besitzen.

Die 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure (C_5N) hat nach Ringschluß an C-5 keinen Substituenten. Sie stellt dann die Pyrrol-2-carbonsäure dar (vgl. Abb. 30) und verhält sich wie diese in der Bial/Svennerholm Reaktion (vgl. Abb. 57 u. 58).
Die 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure (C_6N) liefert nach Ringschluß und Dehydratisierung eine 5-Methylen-pyrrol-2-carbonsäure (vgl. Abb. 29). Sie besitzt also ebenfalls nicht den essentiellen $-CH_2-C{<}^{O}_{R}$ Rest an C-5 des Pyrrols, der zum Chromophor führt.

c) Mit der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure (C_7N) ist, wie zu erwarten, die Ausbildung eines Chromophors in der Bial/Svennerholm Reaktion zu erzielen. Bei dem sich bildenden Chromogen handelt es sich um 5-(2-Keto-äthyl)-pyrrol-2-carbonsäure (Abb. 27). Der Substituent an C-5 unterscheidet sich von dem aus Neuraminsäure gebildeten wie Aldehyd zu Keton:

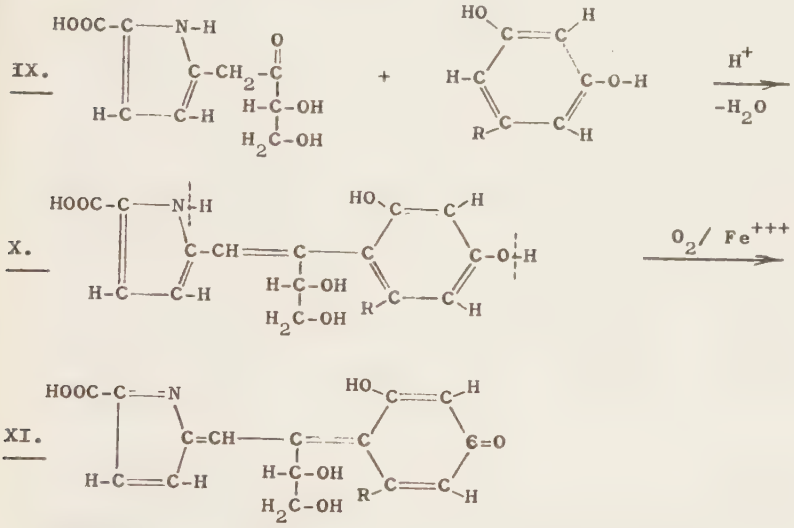
$$-CH_2-C{<}^{O}_{H} \longrightarrow -CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CHOH-CH_2OH$$

Dieser Unterschied dürfte verantwortlich sein für die leichte Verschiebung des Maximums des Bial-Farbstoffes der C_7N im Vergleich mit dem der Neuraminsäure: ca. 20 mμ in den langwelligen Bereich. NeuNAc: λ max = 580mμ; C_7N: λ max = 600 mμ. Der molare Extinktionskoeffizient ist bei C_7N außerdem um ca. 35 % erhöht.

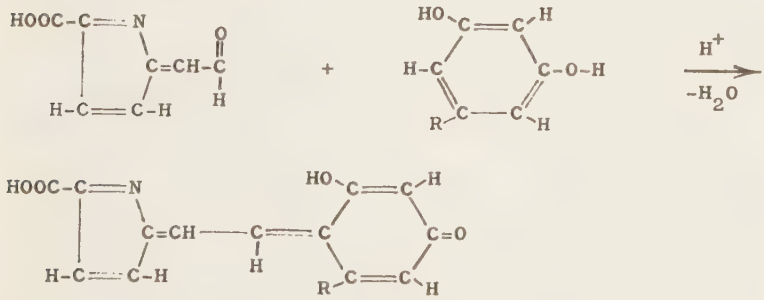
d) Das Oxidationsprodukt (HIO_4-Schnell-Oxidation) der N-Acetyl-neuraminsäure (vgl. Abb. 28) führt nach Cyclisierung und Dehydratisierung zu 5-(Formyl-methylen)-pyrrol-2-carbonsäure. Auch diese Produkt ergibt nach Karkas u. Chargaff (77) das Svennerholm-Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 600 mμ unter Verdopplung des für N-Acetyl-neuraminsäure gültigen molaren Extinktionskoeffizienten. Diese Erscheinung wirft Licht auf die Reaktionsfolge Chromogen $\longrightarrow$ Chromophor:

Abb. 73 Chromophor-Bildung der Bial/Svennerholm Reaktion

a) aus dem Säure-Chromogen der Neuraminsäure



b) aus dem Säure-Chromogen des HIO_4-Oxidationsproduktes der Neuraminsäure



Während nach Kondensation des Neuraminsäure-Chromogens mit dem Hydroxy-phenol (Orcin/Resorcin) wahrscheinlich

eine Oxidation (vgl. Abb. 73) X. $\rightarrow$ XI. zur Ausbildung des Chromophors erforderlich ist, ist diese bei dem HIO_4/ Neuraminsäure-Chromogen bereits im Chromogen-Teil vollzogen. Die Chromophor-Bildung besteht hier nur noch in der Kondensation des HIO_4/Neuraminsäure-Chromogens mit dem Hydroxy-phenol. Diese Tatsache kann den hohen molaren Extinktionskoeffizienten erklären.

e) Der Einsatz von Resorcin anstelle von Orcin hat neben der erwähnten Veränderung des Hauptmaximums um ca. 10 mμ in den langwelligen Bereich noch zur Folge, daß die unaufgelöste Schulter des Bial-Chromophors bei 645 mμ (Abb. 55,56) sowohl bei Neuraminsäure (C_9N) wie auch bei 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure (C_7N) nach 635 mμ verschoben und zusätzlich intensiviert wird. Als Konsequenz wird diese Schulter dann bei C_7N sogar zum Hauptmaximum. Legt man die Struktur XI. (Abb. 73) für das Chromophor zugrunde, so ist der Einfluß des Substituenten R (Orcin: R= CH_3, Resorcin: R= H) auf die chinoide Struktur des Chromophors offensichtlich: Durch R = CH_3 wird der Benzol-Ring aus der planaren Struktur des ganzen Systems stärker herausgedreht als durch R = H.

f) Die Austauschbarkeit der Metallionen (Fe^{+++}/ Cu^{++}) im Reagenz der Bial/Svennerholm Bestimmung ist ohne Einfluß auf die Art des Spektrums der zu bestimmenden Substanz. Ein "Zucker-Orcin-Ion" Komplex (151) als Chromophor ist damit ausgeschlossen. Vielmehr muß an eine rein katalytische Wirkung der Ionen gedacht werden: Enolisierung, Dehydratisierung und Oxidation sind Reaktionsschritte, die solcher Katalyse unterliegen können. Besonders die oxidierende Wirkung dürfte für die Chromophor-Bildung von großem Einfluß sein: Das Kondensationsprodukt X. (Abb. 73) aus Chromophor und Hydroxy-phenol unterliegt wohl leicht einer Autoxidation ähnlich der des Hydrochinons. Ohne Metallionen-Zusatz ist die Farbstoff-Ausbeute wesentlich verringert.

g) Das Reagenz- Hydroxy-phenol - ist nicht, wie Svennerholm annimmt, ein typischer Reaktionspartner für Ketosen und Furfural (151). Generell ergeben alle ungesättigten und aromatischen Aldehyde und leicht enolisierbaren Ketone Kondensationsprodukte (5), die, teils unlöslich im Reaktionsgemisch, gefärbte Verbindungen darstellen (vgl. Tab.3). Es kommt eben nur darauf an, in welchem Maße solche ungesättigten Aldehyde aus den einzelnen Kohlenhydraten entstehen.
In der Reihe der Aldosen bzw. Hexosen sind es vor allem Substanzen mit drei, fünf und sieben C-Atomen in einer Kette (vgl. Tab. 4 und L.c. 151), die relativ hohe molare Extinktionen besitzen. Die Abbau-Produkte der Zucker, die selbst schon ungesättigte bzw. aromatische Aldehyde darstellen, können natürlich als solche oder nach weiterem Säure-Abbau reagieren (vgl. Tab. 7 und Abb. 63 - 65).

h) Der von Gottschalk (61) vorgeschlagene Reaktions-Mechanismus ist nicht haltbar,da - wie unter a) beschrieben - keine der drei 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren C_5OH, C_6OH, C_9OH unter den Bedingungen der Bial-Bestimmung eine der Neuraminsäure vergleichbare Absorption aufweist (Abb. 66) (vgl. auch Abb. 26). Die schon in der Literatur (168)(100) erwähnte und hier erneut bestätigte Änderung des Absorptions-Spektrums der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure (C_7N) ist ebenfalls mit Gottschalks Schema unvereinbar. Die von ihm postulierte Zwischenstufe (vgl. Abb. 17 und 26) sollte auch bei einer 7-atomigen C-Kette zu den gleichen Furan- und Humin-Körpern führen.

i) Die Absorptions-Maxima der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure und -hexonsäure (C_5N u. C_6N) bei der Bial/Svennerholm Reaktion liegen bei 400-500 mμ. Auch Pyrrol und Pyrrol-2-carbonsäure haben vergleichbare Spektren in diesem Bereich. Die in diesen Fällen festzustellenden Farbstoffe sind aber keine Kondensations-Produkte mit dem

Hydroxy-phenol mehr, sondern stellen Polymerisate der eingesetzten und zu Pyrrolen umgewandelten Substanzen dar. Denn auch in Abwesenheit von Orcin/Resorcin bilden sich bei 100°C in 5 nHCl die gleichen Absorptionen.

Ein ähnlicher Polymerisations-Vorgang tritt auch bei den längerkettigen 5-Acetamido-aldonsäuren C_7N und C_9N (NeuNAc) ein, wenn sie in hohen Konzentrationen der Bial/Svennerholm Reaktion unterzogen werden (Abb, 60). Häufig fallen die Polymerisate als braun-graue Niederschläge aus und sind nur sehr schwer in Lösung zu bringen (Humin-Bildung). Auch die Absorptionsspektren von C_7N und C_9N unter analytischen Bedingungen (0,4 µMol/ml) weisen bisweilen um 450 mµ kleine Maxima auf (Abb. 55 u. 56). Sie sind demnach polymerisierten Pyrrolkörpern zuzuordnen.

k) Die 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren (Hydroxyl-Analoge der Neuraminsäure) reagieren unter Konzentrations-Erhöhung nur äußerst gering mit einer breiten unspezifischen Absorption um 570 mµ (Abb. 67). Diese Absorption hat bei den Untersuchungen über Pflanzen-Neuraminsäure (114)(128) offensichtlich einen Gehalt an Neuraminsäure vorgetäuscht. Denn nach Gielen (53) haben die betreffenden Pflanzen einen hohen Gehalt an entsprechenden 2-Keto-3-deoxy-aldonsäuren

l) Die für die Chromophor-Bildung verantwortliche ß,γ-ungesättigte Carbonyl-Funktion der 5-(2-Keto-3,4-dihydroxybutyl)-pyrrol-2-carbonsäure (Abb. 31 u. 73) kann sich nach a) nur ausbilden. wenn an C-5 der 2-Keto-3-deoxy-aldonsäure eine Amino-Gruppe befindet. Jedoch müssen auch andere Substanzen mit enolisierbarer ß,γ-ungesättigter Carbonyl-Funktion (vgl. Abb. 31) in der Bial/Svennerholm Reaktion einen Farbstoff ergeben. So weisen die entsprechenden UV-Absorptionsspektren von Propandialdehyd und Glutacandialdehyd (Abb, 68 u. 69) in diser Reaktion ein in Lage und Extinktions-Koeffizient vergleichbares, aber mit Neuraminsäure keinesfalls identisches Maximum auf.

Mit den hier beschriebenen Ergebnissen der Untersuchungen über die Chromogen-Bildung und Chromophor-Bildung der Neuraminsäure und verwandter Substanzen in der Bial/Svennerholm Reaktion werden die aufgestellten Hypothesen weitgehend gestützt.

N-Acyl-neuraminsäure lagert sich unter N-Deacylierung zu 5-Tetrahydroxybutyl-pyrrol-2-carbonsäure um. Durch Dehydratisierung entsteht daraus das eigentliche Chromogen:

5-(2-Keto-3,4-dihydroxy-butyl)-pyrrol-2-carbonsäure.

Die Keto-Gruppe an C-7 dieser Substanz bietet nun ein Zentrum für den nukleophilen Angriff von Orcin/Resorcin. Nach Kondensation und Autoxidation entsteht dann ein Methin-Farbstoff, der offensichtlich das Chromophor der Bial/Svennerholm Reaktion darstellt.

3. Ausblick

Die bisherigen in der Literatur beschriebenen Reaktionen der Neuraminsäure und die vorstehend geschilderten Untersuchungen wecken ein gutes Verständnis für das chemische Verhalten der Neuraminsäure und ihrer Derivate. An Hand von weiteren synthetischen Modellen können jedoch noch zahlreiche ungeklärte Phänomene diser Substanz bearbeitet werden. Vor allem der Mechanismus der Stickstoff-Deacylierung im sauren und alkalischen Milieu und die Chromophor-Bildung aus Chromogen und Hydroxy-phenol bei der Bial/Svennerholm Reaktion sind anhand der aufgestellten Hypothesen eingehend zu studieren.

Was die Aminoff/Warren Reaktion anbetrifft, so bedarf es auch dort für einige Spezial-Probleme noch weiterer Untersuchungen. Für die Abnahme der molaren Extinktions-Koeffizienten bei verschiedener O-Substitution und der N-Glykolyl-Substitution der Neuraminsäure gibt es zwar plausible Erklärungen, aber keine experimentell bewiesene Deutungen.

Für die endgültige Aufklärung der Direkten Ehrlich Reaktion der Neuraminsäure bietet sich infolge der relativen Stabilität die Isolierung des Chromophors selbst an.

Die größtenteils erstmals synthetisierten Analogen der Neuraminsäure bieten neben der Möglichkeit zum chemischen Vergleich auch die Verwendbarkeit als Substrate für den biochemischen Vergleich:
Die Reaktionen der Neuraminsäure-spezifischen Enzyme Aldolase[+] und Neuraminidase[++] lassen sich von der Substratseite her näher charakterisieren. Dabei sind für das letztere Enzym

---

[+] N-Acetyl-neuraminate pyruvate-lyase EC 4.1.3.3

[++] N-Acetyl-neuraminate glycohydrolase EC 3.2.1.18

synthetische Glykoside der 2-Keto-3-deoxy-aldosen un d der 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldosen entsprechend den bekannten Methoden zu gewinnen. Nachdem bereits der Einfluß von O- und N- Substitution (141)(117) und Glykon-Struktur bekannt ist, wird damit der Einfluß von Kettenlänge und Acylamido-Gruppierung auf die Substratspezifität der genannten Enzyme faßbar.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Untersuchung der Chromogen-Bildung der Neuraminsäure werden folgende analoge bzw. homologe Substanzen - teils erstmalig - in Anlehnung an bekannte Verfahren dargestellt und charakterisiert:

   a) Aldolkondensation nach Kuhn u. Baschang liefert:
   2-Keto-3-deoxy-pentonsäure
   2-Keto-3-deoxy-hexonsäure
   2-Keto-3-deoxy-nononsäure
   2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure
   2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-hexonsäure

   b) Zur Gewinnung der 5-Acetamido-aldonsäuren werden als Ausgangssubstanzen neu synthetisiert:
   N-Acetyl-amino-acetaldehyd
   2-Deoxy-2-acetamido-L-glycerinaldehyd

   c) Perjodat-Oxidation und anschließende Reduktion von N-Acetyl-neuraminsäure-ß-methylglykosid nach Kuhn u. Gauhe führen zu:
   2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-heptonsäure-ß-methylglykosid

2. Das Neuraminsäure-typische Chromophor der Bial/Svennerholm Reaktion entsteht nur aus 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-aldonsäuren mit einer C-Kettenlänge von sieben und höher. Die kürzer-kettigen 5-Acetamido-Analogen und alle Stickstoff-freien Homologen der Neuraminsäure ergeben diese Reaktion nicht. Diese Befunde führen zu folgenden Schlüssen im Hinblick auf die Chromogen- und Chromophor-Bildung in der Bial/Svennerholm Reaktion:

a) Durch Deacylierung des Stickstoffs entsteht als Prächromogen der Neuraminsäure 5-Tetrahydroxybutyl-pyrrol-2-carbonsäure.

b) Daraus bildet sich durch Dehydratisierung das Chromogen 5-(2-Keto-3,4-dihydroxy-butyl)-pyrrol-2-carbonsäure.

c) Die Carbonyl-Funktion an C-2 der Seitenkette des Chromogens kondensiert im Sauren mit Hydroxy-phenolen zu einem langkettigen konjugierten System.

d) Durch Autoxidation in Gegenwart von Metallionen ergibt das Kondensat einen Methin-Farbstoff, das Chromophor der Bial/Svennerholm Reaktion.

e) Andere Theorien der Chromogen-Bildung (Gottschalk 1962), denen zufolge auch die Stickstoff-freien Analogen der Neuraminsäure die Farbreaktion nach Bial/Svennerholm geben müßten, sind damit widerlegt.

3. Der von Paerels und Schut aufgestellte Mechanismus der Aminoff/Warren Reaktion der Neuraminsäure wird bestätigt: Nach der Perjodat-Oxidation der Neuraminsäure und vor der Kondensation zum Chromophor ist eine Aldol-Spaltung zwischen C-4 und C-5 zu fordern. Denn weder aus 2-Keto-3,5-dideoxy-5-acetamido-pentonsäure noch aus der entsprechenden Hexonsäure, die beide nicht zur Aldol-Spaltung befähigt sind, bildet sich das Chromogen ß-Formylbrenztraubensäure.

Herrn Professor Dr. H. Faillard schulde ich aufrichtigen Dank für die Überlassung des Themas und für die Förderung und Unterstützung, die er mir bei der Durchführung der Arbeit zuteil werden ließ.

LEBENSLAUF

Am 16. Februar 1940 wurde ich als Sohn des Karosseriebaumeisters Franz Peitz und seiner Ehefrau Cäcilia, geb. Schulte-Ortmann in Bremke / Kreis Meschede geboren. Im Jahre 1941 starb mein Vater, und 1960 wurde ich von Herrn Pfarrer Heinrich Wirtz adoptiert.

Von 1949 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Bremke und anschließend das Staatliche Altsprachliche Apostelgymnasium in Köln. Im März 1960 legte ich dort die Reifeprüfung ab und nahm im Sommersemester desselben Jahres an der Universität Köln das Studium der Chemie auf.

Im Juli 1963 legte ich die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab. Im Jahre 1964 erwarb ich das "Certificate of Proficiency in English" der Universität Cambridge und unterbrach anschließend mein Studium für eine viermonatige Praktikanten-Tätigkeit bei der "Shell Research Ltd.", Sittingbourne/ Kent (England).

Nach der bestandenen mündlichen Diplom-Chemiker-Hauptprüfung fertigte ich von August 1965 bis April 1966 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln unter Leitung von Prof. Dr. E. Klenk eine Diplomarbeit an über das Thema: "Über die Spaltung des Submaxillarismucins vom Rind durch das Receptor-Destroying-Enzyme". Seither arbeite ich im Institut für Physilogische Chemie der Ruhr-Universität Bochum - ab August 1967 als Wissenschaftlicher Assistent m.d.V.b. - über die Struktur und die Synthesen der Acylneuraminsäuren und analoger Substanzen. Aus diesem Problemkreis führte das Thema der Chromogen-Bildung zur vorliegenden Dissertation.

Ferdinand Wirtz-Peitz

Druck: A. Wasmund-Bothmann Köln-Sülz, Zülpicherstr. 220 Telefon 444152